

Juan S. Jiménez Martínez

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA
RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN
FOSFORILASA b**



Biblioteca Universitaria de Granada



01533692

**TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Juan S. Jiménez Martínez

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA
RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN
FOSFORILASA b**



Biblioteca Universitaria de Granada



01533692

TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

T
12
42

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RELACION
ESTRUCTURA-FUNCION EN FOSFORILASA b

JUAN S. JIMENEZ MARTINEZ
Tesis doctoral

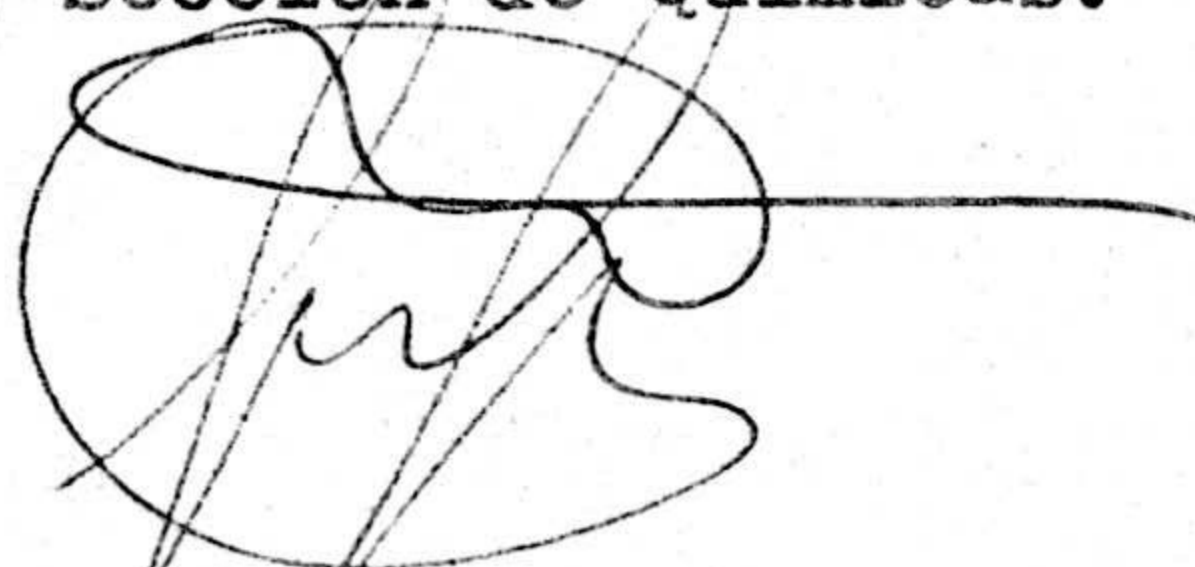


UNIVERSIDAD DE GRANADA

1976

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RELACION
ESTRUCTURA-FUNCION EN FOSFORILASA b

Trabajo presentado para aspirar al Grado de DOCTOR
EN CIENCIAS, Sección de Químicas.



Firmado: Juan S. Jiménez Martínez, Licenciado en
Ciencias, Sección de Químicas.

Visado en Granada, a 1 de Junio de 1976

EL DIRECTOR DE LA TESIS



Prof. Dr. D. Manuel Cortijo Mérida
Catedrático y Director del Depar-
tamento de Química Física de la Fa-
cultad de Ciencias de la Universi-
dad de Granada.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha

2 JUN. 1976

ENTRADA NUM.

2135

Mi agradecimiento:

Al Dr. D. Manuel Cortijo

Al P.F.P.I., por la beca que he disfrutado a lo largo de la realización de esta memoria.

A la fundación J. March, por la ayuda a la investigación prestada a este Departamento.

Al Dr. D. Francisco García-Blanco, por sus oportunas sugerencias.

Al Dr. D. Julio López Gorgé, por las facilidades recibidas de su Departamento.

A María Vargas Gualda, por sus dibujos.

A todos los compañeros del Departamento de Química Física, por nuestra convivencia.

A mis padres, por su aliento.

A Mari,
mi mujer

I N D I C E G E N E R A L

INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCION	
A) LA FOSFORILASA DEL GLUCOGENO.....	3
B) ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	15
1.- Breve resumen de los problemas actuales acerca de la fosforilasa.....	15
2.- Sitio del PLP y misión de este cofactor....	17
3.- Grupos funcionales.....	23
4.- Resumen final.....	33
EXPERIMENTAL	
A) MATERIALES.....	39
1.- Obtención de fosforilasa.....	39
2.- Preparación de fosforilasa libre de AMP y medida de la concentración.....	43
3.- Preparación de apofosforilasa.....	45
4.- Albúmina de suero de vaca.....	47
5.- Acido adenosin-5'-fosfórico, fosfato de piridoxal y tetranitrometano.....	48
6.- Preparación y purificación de sal de Fremy.....	49

7.- Disoluciones reguladoras.....	51
8.- Otros productos.....	55
B) METODOS.....	57
1.- Medida de la actividad enzimática.....	57
2.- Polarografía.....	63
3.- Espectroscopía.....	65
4.- Valoración de cisteínas.....	66
5.- Reacción con TNM.....	68
6.- Reacción con sal de Fremy.....	69
7.- Filtración con gel de sephadex.....	70
8.- Análisis de datos cinéticos.....	72
9.- Fluorescencia.....	74

RESULTADOS

A) ESPECTROSCOPIA Y POLAROGRAFIA.....	79
1.- Polarografía del complejo PLP-cisteína....	79
2.- Polarografía del complejo PLP-albúmina....	83
a) Espectroscopía.....	83
b) Fluorescencia.....	88
c) Polarografía del complejo PLP- albúmina (sitio I).....	96
d) Polarografía de albúmina.....	102
e) Polarografía del complejo PLP- albúmina (sitio II).....	106
3.- Polarografía de fosforilasa b.....	109

B) MODIFICACION QUIMICA MEDIANTE EL	
USO DE TNM.....	115
1.- Inactivación de la enzima por trata-	
miento con TNM.....	115
2.- Influencia del efector alostérico,	
AMP, sobre la inactivación.....	124
3.- Determinación del número de tirosinas	
modificadas.....	128
4.- Determinación del número de cisteínas	
modificadas.....	135
5.- Influencia del AMP sobre el número de	
tirosinas y cisteínas modificadas.....	141
6.- Fijación de AMP por la enzima modificada.	142
7.- Cinética de la reacción con TNM.....	145
8.- Cinética de la reacción con DTNB.....	148
C) MODIFICACION QUIMICA MEDIANTE EL USO DE	
SAL DE FREMY.....	151
1.- Reacción de sal de Fremy con tirosina....	151
2.- Reacción con ME y L-cisteína.....	153
3.- Reacción de sal de Fremy con PLP.....	154
4.- Inactivación de la enzima por trata-	
miento con sal de Fremy.....	156
5.- Espectroscopía de fosforilasa tratada	
con sal de Fremy.....	160
6.- Determinación del número de tirosinas	
modificadas mediante el uso de espec-	
troscopía diferencial.....	163

7.- Influencia del efector alostérico, AMP, sobre el tratamiento de la enzi- ma con sal de Fremy.....	167
8.- Cinética de la reacción de fosforilasa con sal de Fremy.....	171
9.- Análisis de aminoácidos.....	177
10.- Modificación de fosforilasa utilizando mayores concentraciones de la misma.....	182
11.- Otros restos aminoácidos.....	186
DISCUSION.....	191
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	229
BIBLIOGRAFIA.....	236

INDICE DE FIGURAS

<u>Fig.</u>	<u>p.</u>	<u>Fig.</u>	<u>p.</u>	<u>Fig.</u>	<u>p.</u>
1	4	25	108	49	159
2	7	26	110	50	161
3	8	27	112	51	164
4	9	28	113	52	168
5	11	29	116	53	170
6	12	30	118	54	172
7	14	31	119	55	173
8	53	32	121	56	174
9	54	33	122	57	175
10	60	34	125	58	178
11	64	35	126	59	179
12	80	36	130	60	181
13	82	37	131	61	183
14	84	38	132	62	185
15	86	39	134	63	204
16	87	40	139	64	207
17	89	41	144	65	209
18	91	42	146	66	212
19	92	43	147	67	221
20	95	44	149		
21	98	45	150		
22	99	46	152		
23	103	47	155		
24	105	48	158		

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>p.</u>
I	96
II	100
III	100
IV	101
V	102
VI	106
VII	109
VIII	114
IX	136
X	137
XI	141
XII	156
XIII	156
XIV	166
XV	169
XVI	184
XVII	186
XVIII	188

ABREVIATURAS

- ANSA: ácido 4-amino-3-hidroxi-naftalen-1-sulfónico
- AMP: adenosin-5'-monofosfato
- ATP: adenosin-5'-trifosfato
- p-ClMB: p-cloromercuribenzoato
- DMF: N,N-dimetilformamida
- Dopacromo: 2-carboxi-5,6-dihidroxi indol
- Dopaquinona: quinona de la 3,4-dihidroxi-fenilalanina
- DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
- EDTA: etilendiamino tetraacetato
- BSA: albúmina de suero de vaca
- fosforilasa b: α 1,4-glucan: ortofosfato glucosil transferasa
- G-6-P: glucosa-6-fosfato
- G-1-P: glucosa-1-fosfato
- Gly-Gly: glicil-glicocola
- ME: mercaptoetanol
- NADP: nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato
- nitroformiato: anión del nitroformo o anión del trinitro metano, $(\text{NO}_2)_3 \text{C}^-$.
- PIPES: N-N'-bis (ácido 3-etanosulfónico)piperazina
- PLP: fosfato de piridoxal
- sal de Fremy: nitrosodisulfonato potásico
- sF/F: relación molar sal de Fremy: fosforilasa
- SH: grupo sulfhidrilo
- TNM: tetranitrometano
- TNM/F: relación molar TNM:fosforilasa

tris-Cl⁻: disolución de tris (hidroximetil)aminometano, llevada a un pH dado con ácido clorhídrico.

UDPG: uridin-5'-difosfato glucosa.

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Los objetivos perseguidos en la realización de esta memoria se pueden resumir brevemente de la siguiente forma:

1.- Montar y poner a punto un laboratorio con las técnicas imprescindibles para realizar estudios sobre enzimas, a un nivel molecular: cámara frigorífica, centrifugación, filtración por gel de sephadex, espectroscopía, polarografía, etc.,.

2.- Obtención de la fosforilasa b a partir de músculo esqueletal de conejo, purificación y cristalización de la enzima.

3.- Puesta a punto de la medida de la actividad enzimática específica de la fosforilasa.

4.- Reducción polarográfica de la enzima obtenida.

5.- Estudios de modificación química de fosforilasa mediante el uso de dos diferentes reactivos.

I N T R O D U C C I O N

A) LA FOSFORILASA DEL GLUCOGENO

Para entender el control metabólico en un sentido amplio, hemos de ser capaces de describir los diversos factores que determinan el flujo de substratos a través de una determinada ruta metabólica. Es decir, la disponibilidad de substratos y cofactores, la actividad catalítica de las enzimas que intervienen en dicha ruta, la cantidad de cada enzima presente, la demanda del substrato inicial o intermedios por las diversas reacciones en competición, etc. El flujo a través de toda la ruta puede modularse mediante el enlace de moléculas efectoras o iones en el sitio activo, o en otra parte de cualquier enzima de dicha ruta metabólica.

El estudio de las propiedades catalíticas de una enzima aislada es una etapa necesaria, y previa, para poder abordar el estudio de complejos multienzimáticos a un nivel molecular, y por lo tanto, el de una determinada ruta metabólica.

La enzima objeto de nuestro estudio es la fosforilasa del glucógeno (E.C.2.4.1.1.) que regula la primera etapa de la ruta metabólica por la cual el glucógeno se transforma en glucosa - 6 - fosfato y de ésta en energía (fig.1). Aunque este hecho podría ser suficiente para justificar el estudio de dicha enzima, durante cerca de cuarenta años se han ido acumulando toda una serie de razones que hacen más apasionante su estudio; algunas de las cuales son:

1) Desde los primeros trabajos de los Cori y colaboradores, (1) la fosforilasa fue la primera enzima de la que se co-

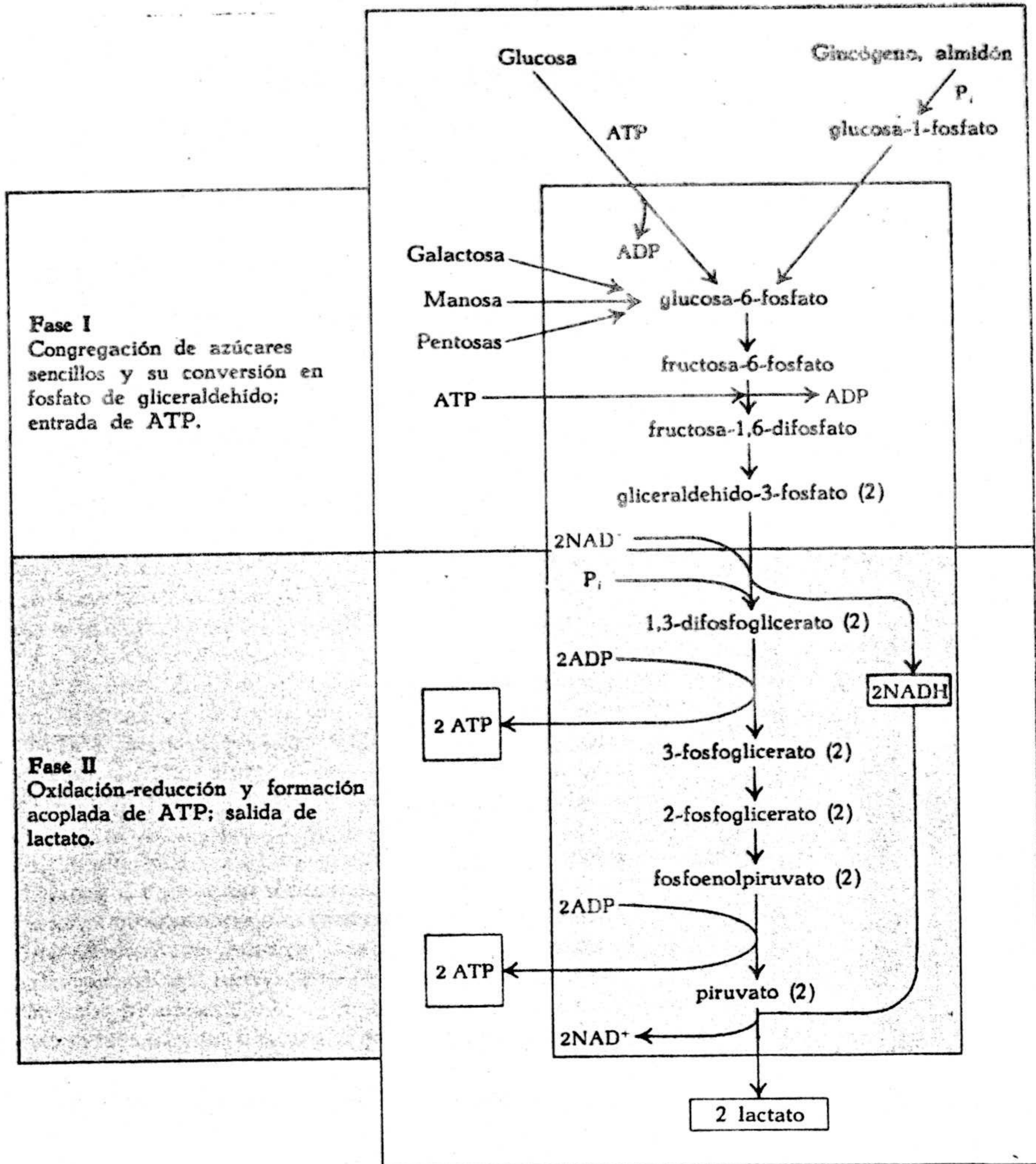


Fig. 1. Las dos fases de la glucólisis

nocieron dos formas: una activa (a), y otra inactiva (b), con la lógica conclusión de que la conversión de una en otra podría servir para controlar el metabolismo del glucógeno.

2) Esta enzima fue el primer caso conocido en el que la interconversión de una forma en otra se debía a una modificación covalente, es decir la fosforilación de un residuo de serina de la proteína (2).

3) Fue la primera enzima en la que se encontró que su actividad estaba controlada por un efector (AMP) que no estaba relacionado estructuralmente con el substrato (3,4). En este caso la activación alostérica está superpuesta al control covalente de la enzima mencionado antes.

4) Fue la primera enzima oligomérica que pudo disociarse en monómeros, de una forma reversible, por substitución de grupos -SH de la proteína (5).

5) Todas las fosforilasas de glucógeno aisladas hasta la fecha, contienen fosfato de piridoxal (PLP) que es indispensable para su actividad enzimática (6). La función que desempeña este cofactor sigue siendo un misterio (7).

6) Finalmente, la fosforilasa pertenece a una ruta metabólica (la utilización del glucógeno) muy regulada a través de un sistema altamente complejo y muy sofisticado. Además, la ruta glucolítica es ubicua en todos los seres vivientes, encontrándose sus enzimas presentes desde los organismos unicelulares hasta los órganos más complejos de los animales superiores, por lo que es ideal para estudios comparativos a lo largo de la evolución. Conviene recordar que la vida, pro

bablemente, surgió en la Tierra en una atmósfera reductora(8) por lo que la glucólisis se desarrolló antes que el metabolismo aerobio de los carbohidratos (ciclo del ácido cítrico).

Existen excelentes revisiones de la fosforilasa, (9,10) por lo que no nos debemos extender en sus generalidades. Sin embargo, el hecho de que sea el primer trabajo que se realiza sobre esta enzima, en esta Universidad, justifica que hagamos una introducción algo más larga de lo que es estrictamente necesario.

Un esquema de la estructura del glucógeno se da en las figuras 2 y 3, en las que se observa que este polímero consiste de cadenas, más o menos ramificadas, de D-glucosa con uniones 1-4 y 1-6. La fosforilasa produce la fosforólisis de las uniones 1-4, existiendo otra enzima que se encarga de romper las uniones 1-6. Aunque el mecanismo de la catálisis y la naturaleza de los residuos implicados no se conocen todavía, una representación de la reacción catalizada por la fosforilasa se da en la figura 4.

La fosforilasa, como cualquier catalizador, cataliza ambas reacciones, la directa y la inversa in vitro, pero solo cataliza la reacción de fosforólisis del glucógeno in vivo. Aunque el equilibrio de la reacción catalizada por la fosforilasa es de 4 a 1 a favor de la síntesis del glucógeno, el bajo nivel de glucosa-1-fosfato en la célula, (debido a que el equilibrio de la fosfoglucomutasa es 17 a 1 a favor de la glucosa-6-fosfato) y la alta concentración de fosfato, aseguran que la reacción catalizada por la fosforilasa in vivo sea la rotu

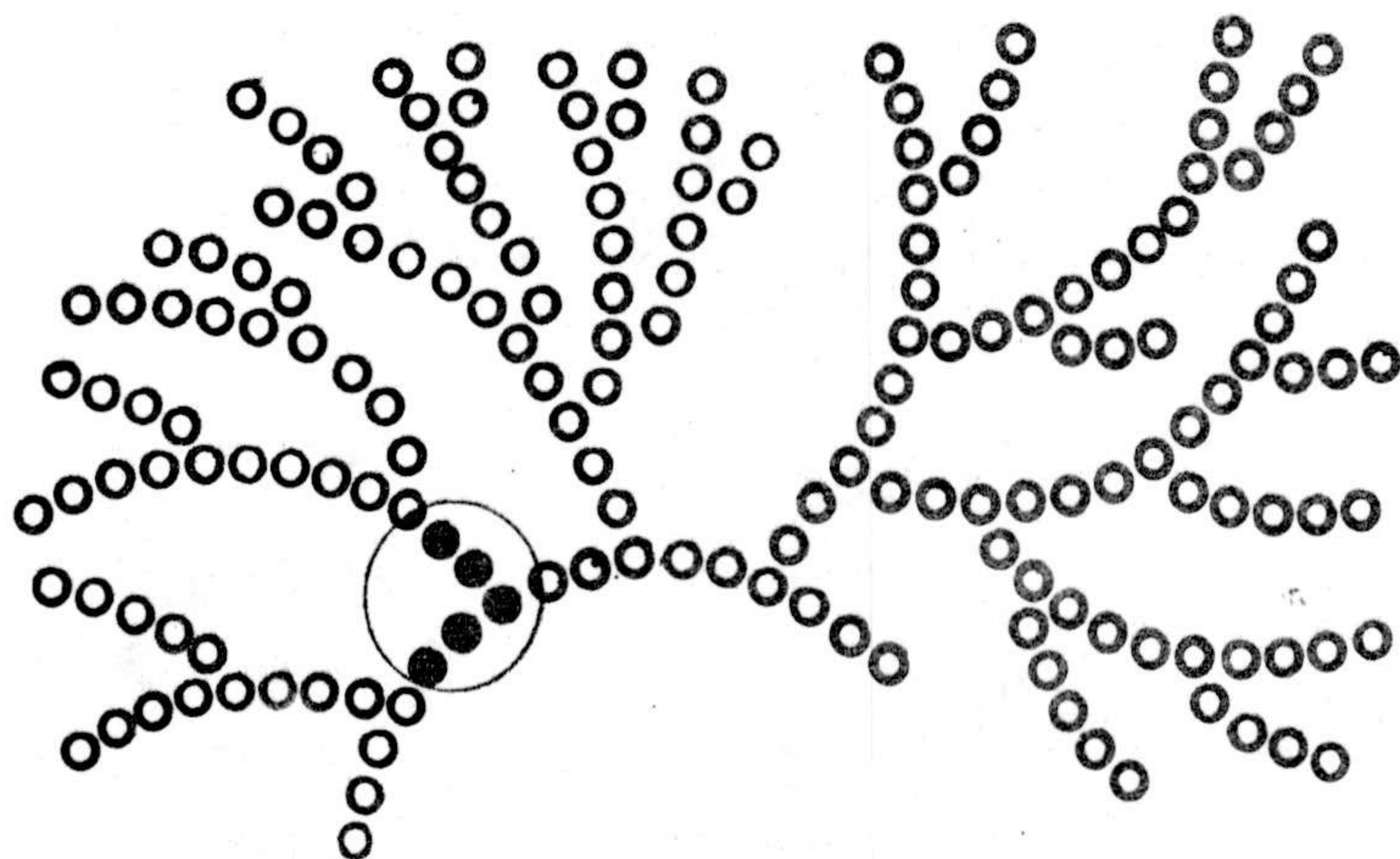


Fig. 2. Estructura del glucógeno.

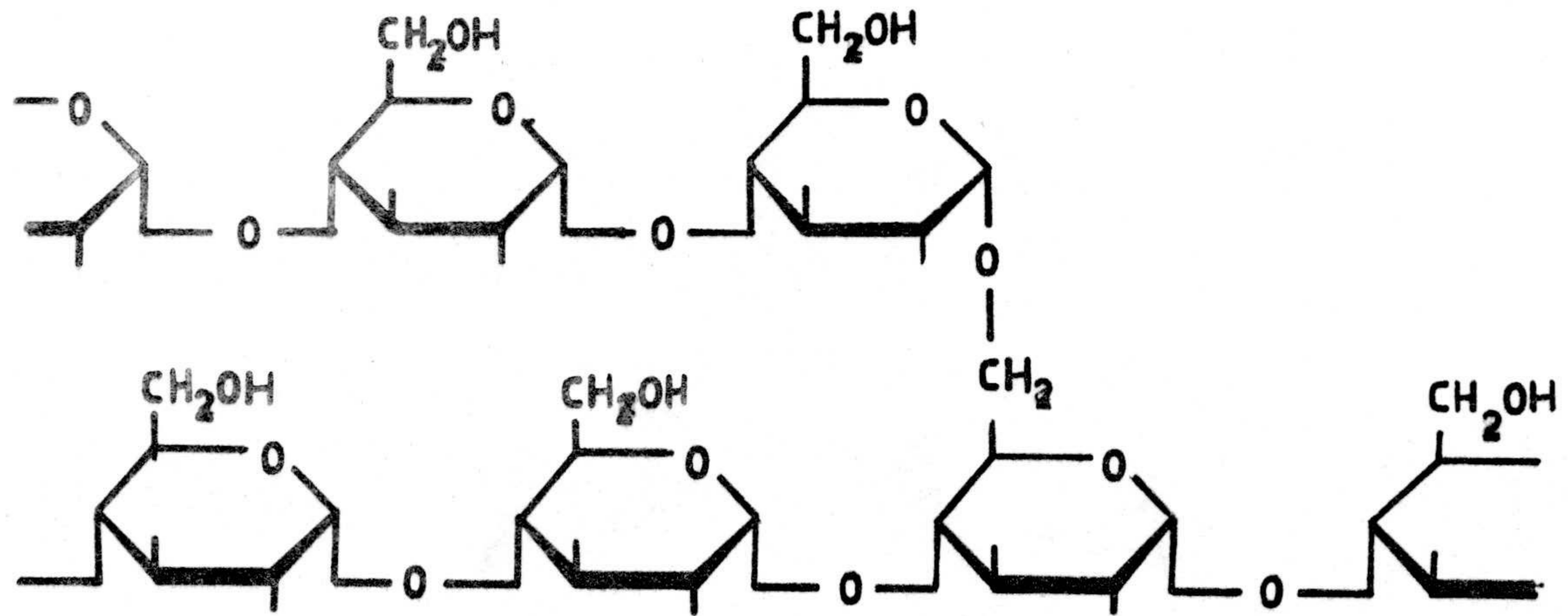


Fig. 3. Estructura del glucógeno. Zona dentro del círculo de la fig. 2.

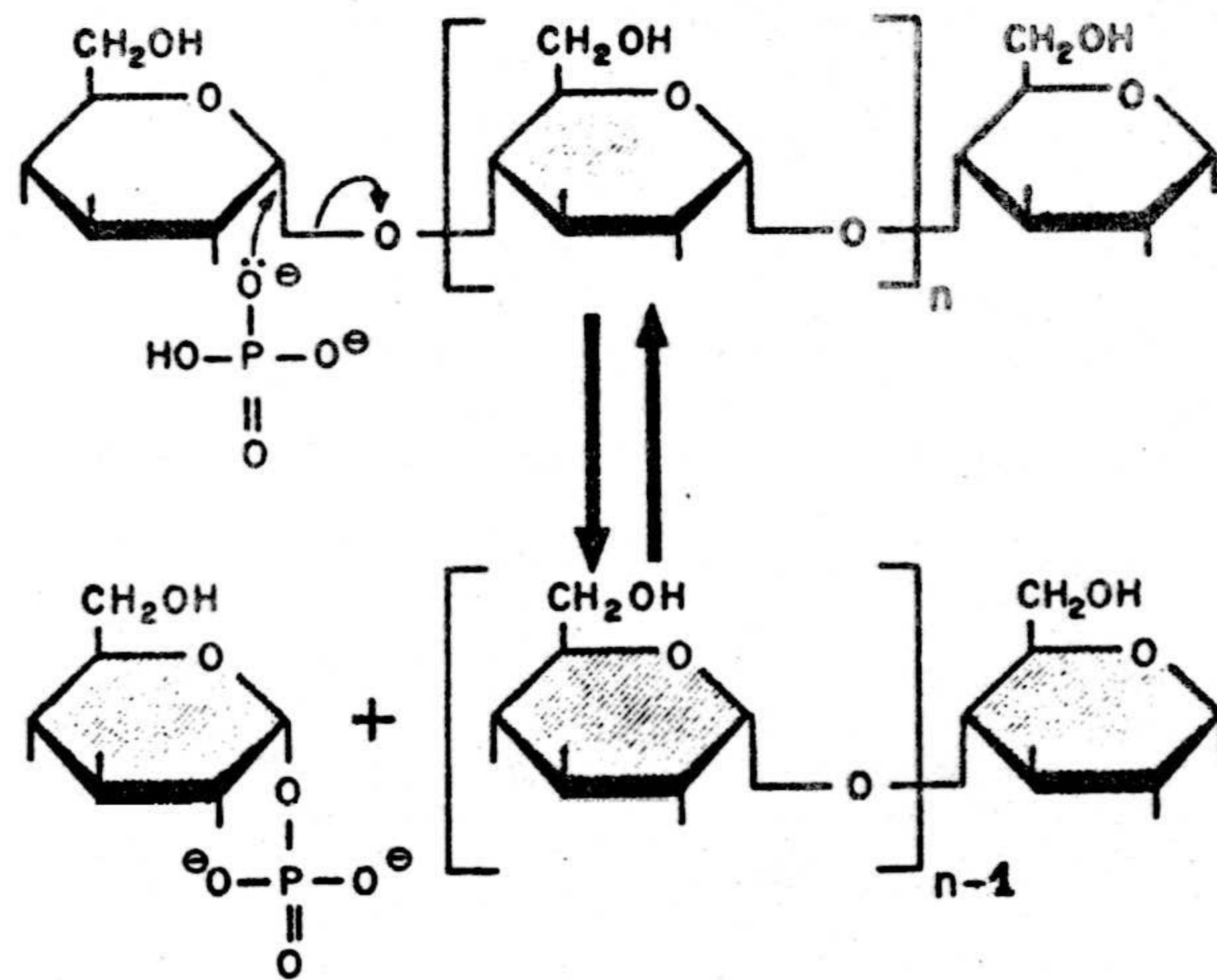


Fig. 4. Reacción catalizada por la fosforilasa del glucógeno.

ra del glucógeno. Para el proceso de síntesis de glucógeno e xiste otra enzima, la sintetasa del glucógeno. Con objeto de centrar la localización de esta enzima en la ruta metabólica de la glucólisis, en la figura 5 damos un esquema de esta ruta.

Una idea del complejo control a que está sometida esta enzima lo puede dar el esquema de la figura 6 en el que he mos eliminado algunas enzimas con objeto de simplificarlo. De talles más completos se encuentran en varias revisiones (9 , 11,12). En este esquema las palabras activa e inactiva son relativas, es decir mayor o menor actividad o necesidad o no de la presencia de alguna otra substancia para la actividad. Por ejemplo, un defecto de energía en forma de exceso de AMP se traduce en una activación de la fosforilasa b que llega a tener niveles de actividad catalítica comparables a los que tiene la fosforilasa a. Por el contrario, la liberación de glucosa-1-fosfato se inhibe con un exceso de ATP o de glucosa-6-fosfato. Datos concluyentes de que el flujo glucolítico aumenta sin necesidad de la conversión de la fosforilasa b en fosforilasa a, se han encontrado en algunos casos, como : en experimentos con órganos perfundidos (13,14) o en animales que no tenían la fosforilasa quinasa(15). Sin embargo la manera usual de activación es la conversión de las formas inactivas o activas, como por ejemplo puede ser la demanda de energía por trabajo mecánico o estimulación del sistema nervioso, ambas conducentes a la liberación de iones Ca^{2+} e iniciación del sistema en cascada. Una descarga hormonal produ-

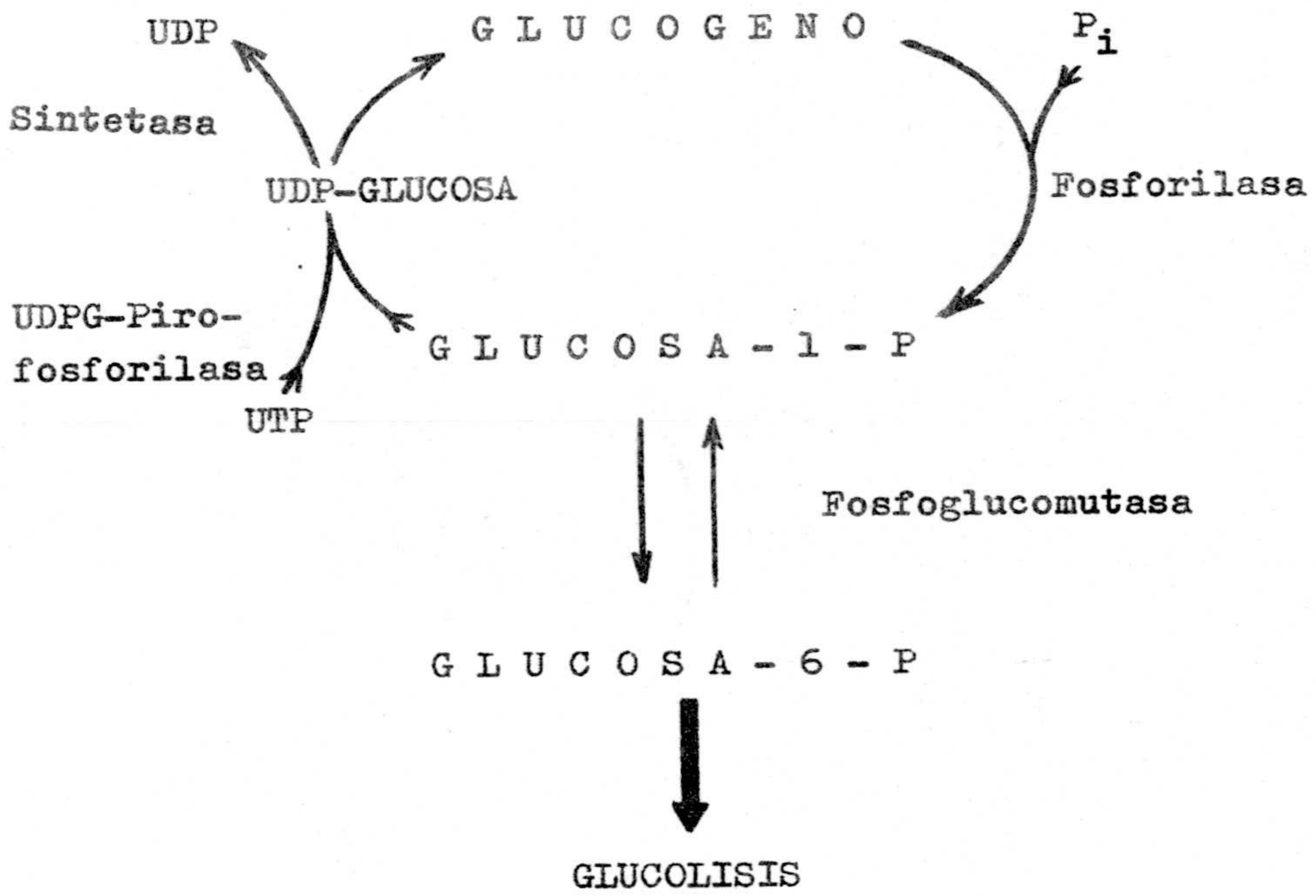


Fig. 5.

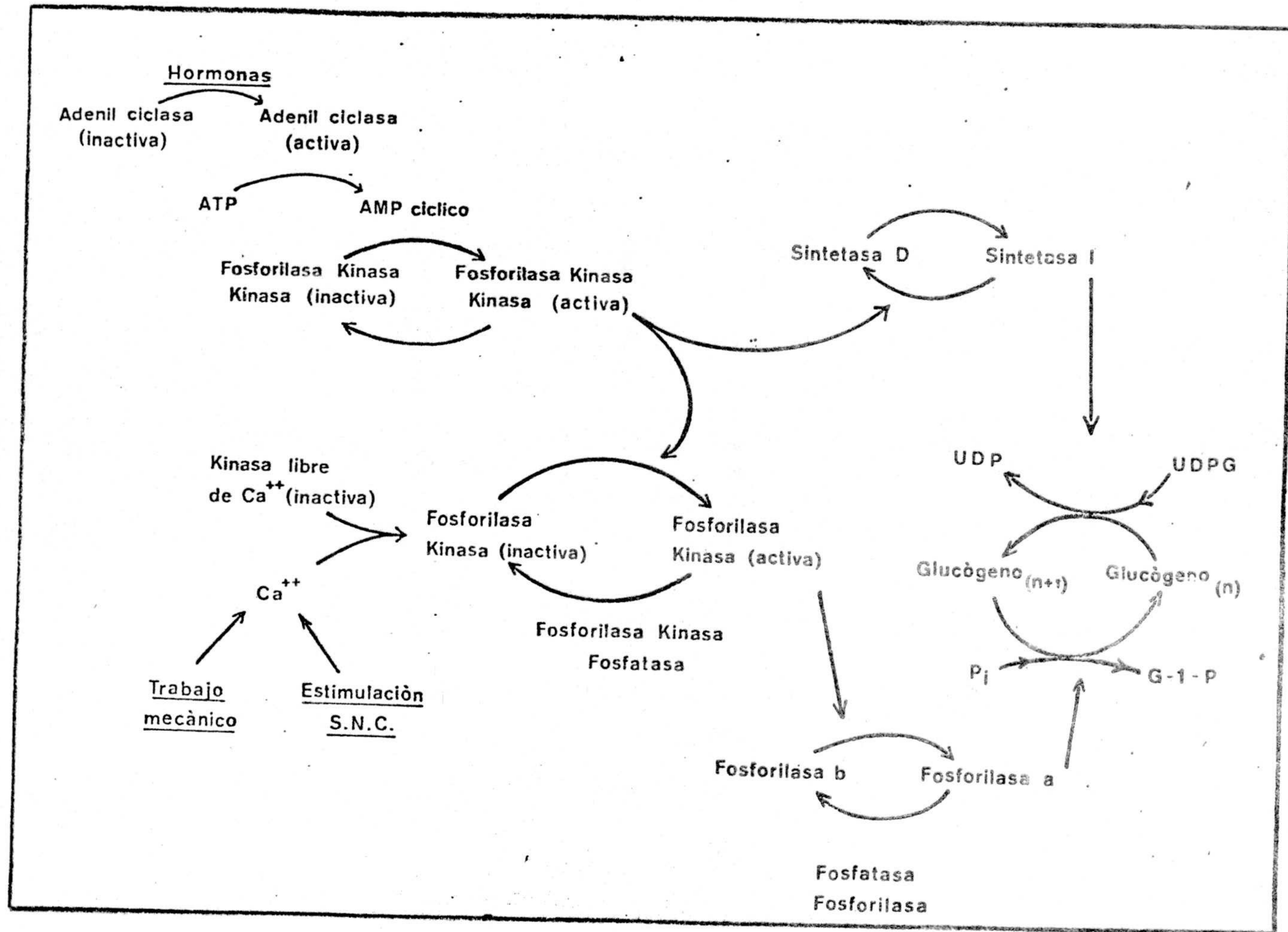


Figura 6

ce parecidos efectos por mediación de la adenil ciclasa.

Sin necesidad de entrar en más detalles, se desprende del anterior comentario la gran complejidad (y por lo tanto versatilidad) y poder de amplificación de los anteriores mecanismos de control. Ello lleva consigo que estas enzimas sean de gran tamaño, con varios "sitios" y frecuentemente con grandes interacciones entre ellos. Así, la fosforilasa necesita tal secuencia de aminoácidos para almacenar toda la información necesaria, que tiene un peso molecular cerca no a 100.000 por protómero, estando en forma dímera o tetrámera dependiendo de las condiciones experimentales.

Un resumen de los sitios de esta enzima se da en el diagrama de la figura 7, en el que no se han representado los sitios de dos inhibidores alostéricos, ATP y UDPG (probablemente los mismos que los del AMP y G-6-P, respectivamente).

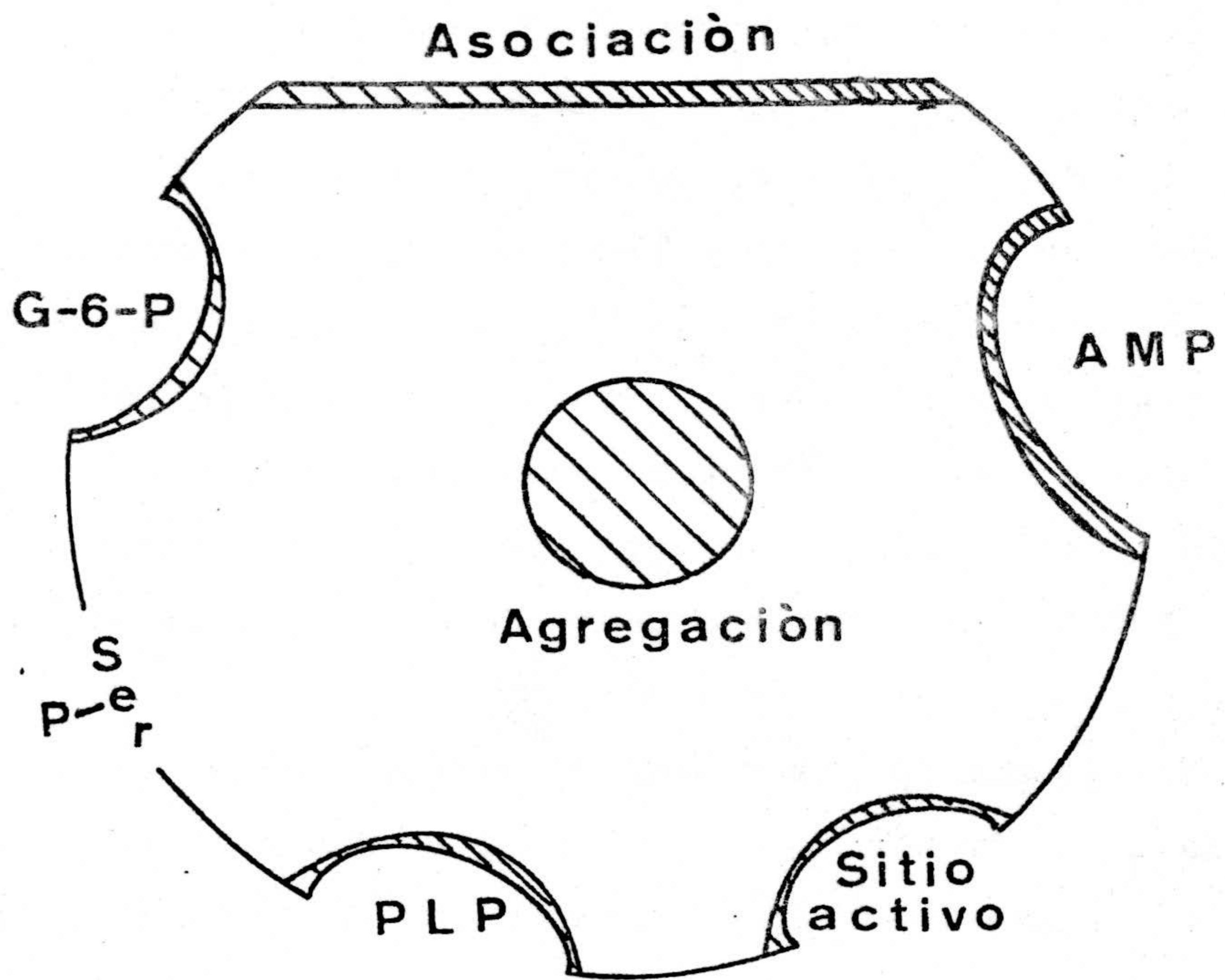


FIGURA 7

B) ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1. Breve resumen de los problemas actuales acerca de la fosforilasa. Aunque desde los primeros trabajos de los Cori (3) han pasado cuarenta años, y un gran número de laboratorios se vienen dedicando al estudio de esta enzima ininterrumpidamente, su estructura es tan compleja que hoy en día existen multitud de problemas sin resolver. Por ello no vamos a hacer nada más que enumerar algunos de los que, a nuestro juicio, parecen más importantes, extendiéndonos un poco más en aquellos en los que creemos que este trabajo contribuye a su elucidación.

Sobre la naturaleza exacta de la reacción catalítica y el sitio activo, prácticamente no se conoce nada (9,10). Algunos estudios se han hecho con análogos de substratos, (o especificidad para éstos) pero solo se han obtenido conclusiones muy generales.

Respecto a la estructura de la enzima, aunque no es bien conocida, se han hecho grandes avances en los dos últimos lustros. Las propiedades físicas se conocen bien, máxime desde que se dispone de los resultados de difracción de Rayos X, todavía a una pobre resolución de 6 Å (16). Lo mismo ocurre con el análisis de aminoácidos de muy diferentes seres vivos e incluso de diferentes órganos (9,10). De la estructura primaria se conoce sobre un 16% del total de aminoácidos (130 de 800): 14 residuos del péptido que se fosforila en

la conversión de fosforilasa b en fosforilasa a (el sitio Ser-P); 53 residuos del péptido al que está unido el fosfato de piridoxal; y el resto de secuencias parciales alrededor de los nueve residuos de cisteina (17,18). Un ambicioso proyecto para conocer la secuencia total de la fosforilasa está siendo llevado a cabo por el grupo de Fischer (19) pero están encontrando una gran cantidad de problemas que retrasan su fin.

Otros interesantes temas de estudio como:

1. Estudio de transiciones alostéricas. Afinidad de la enzima por AMP y sus análogos.

2. Estudio comparativo de fosforilasa a y fosforilasa b

3. Equilibrios asociación-disociación y su conexión con los problemas de desnaturalización-renaturalización.

están siendo abordados por este laboratorio, normalmente coordinado con otros, por lo que no nos referimos más a ellos.

2. Sitio del PLP y misión de este cofactor. El fosfato de piridoxal, PLP, se encuentra presente en todas las fosforilasas aisladas, en cantidades estequiométricas (es decir, una molécula de PLP por subunidad de enzima). La característica más importante de este cofactor de la fosforilasa es la siguiente: mientras que su separación de la enzima, da lugar a una inactivación total (20), la reducción de la proteína con NaBH_4 , capaz de fijar el cofactor a la misma, da lugar a una enzima que tiene un 60% de la actividad original (21,22). Todas las otras enzimas, en las que el PLP está implicado en la catálisis, son totalmente inactivadas en esta clase de tratamiento (23,24).

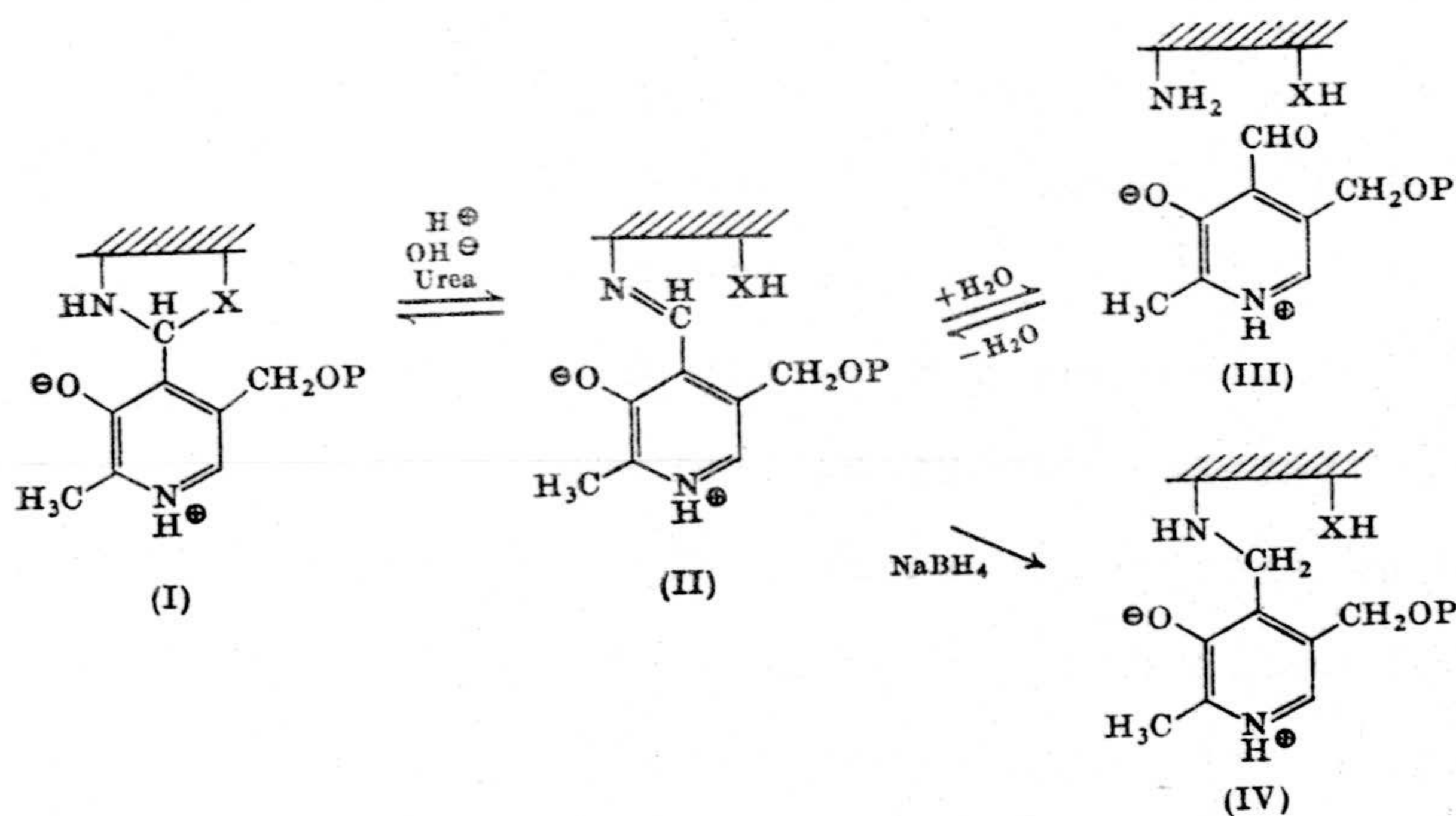
Varias posibilidades podrían explicar su funcionamiento: 1) El PLP está implicado en la catálisis como un grupo portador, como ocurre en otras enzimas dependientes de la vitamina B_6 ; si así fuera, tendría que estar implicado otro grupo funcional diferente del 4-aldehído. 2) La fosforilasa es capaz de catalizar una segunda reacción enzimática, además de la fosforólisis. Sin embargo, no se ha encontrado esa segunda reacción hasta ahora (25). 3) Aunque no esté implicado directamente en la catálisis, puede controlar la actividad de la enzima. Contra esta hipótesis, sin embargo, hay dos razonamientos: a) El mecanismo de control de actividad puede variar de una especie a otra, utilizándose distintos efectores según la especie, sin embargo, el PLP se encuentra en la fosforilasa de todas las especies investigadas (mamíferos, aves, crustáceos, bacterias y plan -

tas superiores). b) Si el PLP fuera un controlador de la actividad, debería disponer de una fácil accesibilidad sobre la enzima, siendo posible, de una manera sencilla, su separación, modificación o alteración del sitio de unión; sin embargo, el PLP está fuertemente enlazado a la fosforilasa y, al parecer, introducido ("buried") dentro de la molécula enzimática, siendo de muy difícil accesibilidad. 4) El PLP no está implicado en la catálisis, ni es un controlador de la actividad, pero es imprescindible para mantener la estructura (conformación) más adecuada para la actividad de la enzima. Desde luego, teniendo en cuenta el número de grupos funcionales que posee la molécula de PLP, sería una buena herramienta para realizar esta función; sin embargo, no cabe duda de que, desde el punto de vista del metabolismo celular, es una forma muy cara de mantener una conformación óptima y es extraño que ciertas especies superiores, en su evolución, no hayan encontrado una forma más conveniente de hacerlo.

Finalmente, expondremos aquellos aspectos sobre la naturaleza del enlace del PLP a la fosforilasa, que han sido objeto de estudio en los experimentos cuyos resultados se escribirán en el capítulo correspondiente.

Sobre las bases del parecido existente entre las propiedades de absorción del sitio del PLP en fosforilasa y las de complejos formados entre el cofactor y ciertos aminoácidos, Kent, Krebs y Fischer (26) propusieron que, a pH neutro, el PLP se enlazaba a la proteína mediante una estructura

ra de aldimina substituida (I), donde el grupo X podría ser un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo, aunque nunca ha sido identificado.

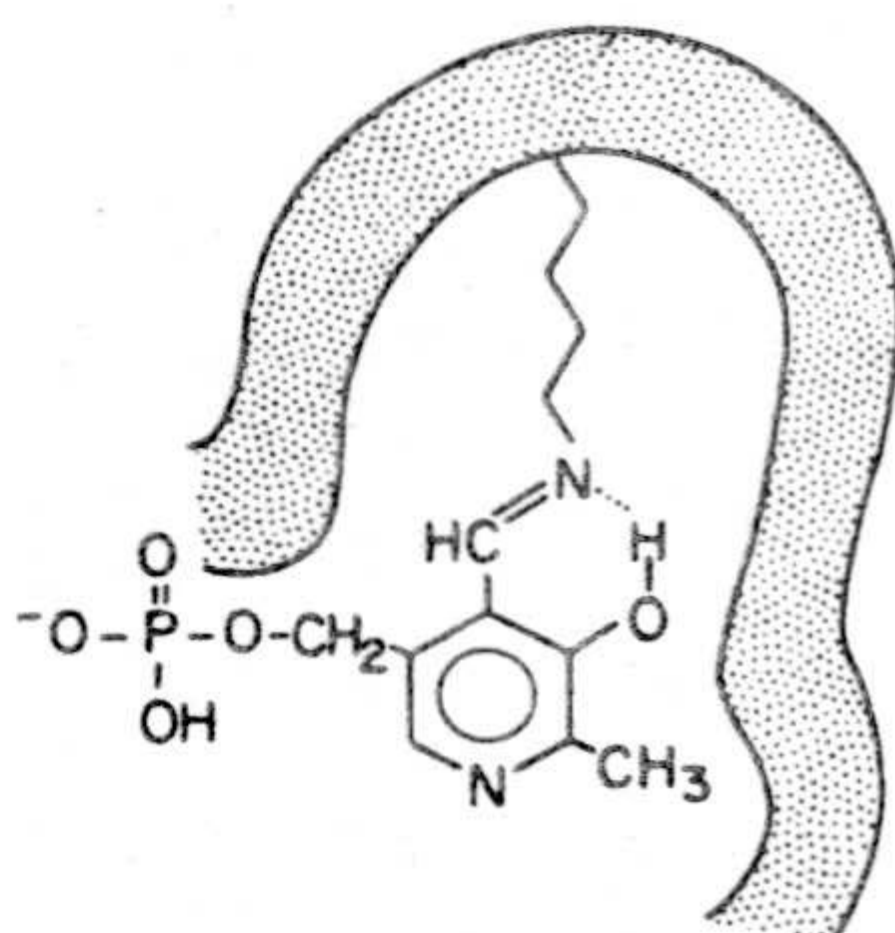


Esta estructura de aldimina substituida estaría en acuerdo con el hecho de que la reducción de la enzima con NaBH₄ es imposible a pH neutro (26). Únicamente después de la conversión de esta estructura en una base de Schiff (II) bien

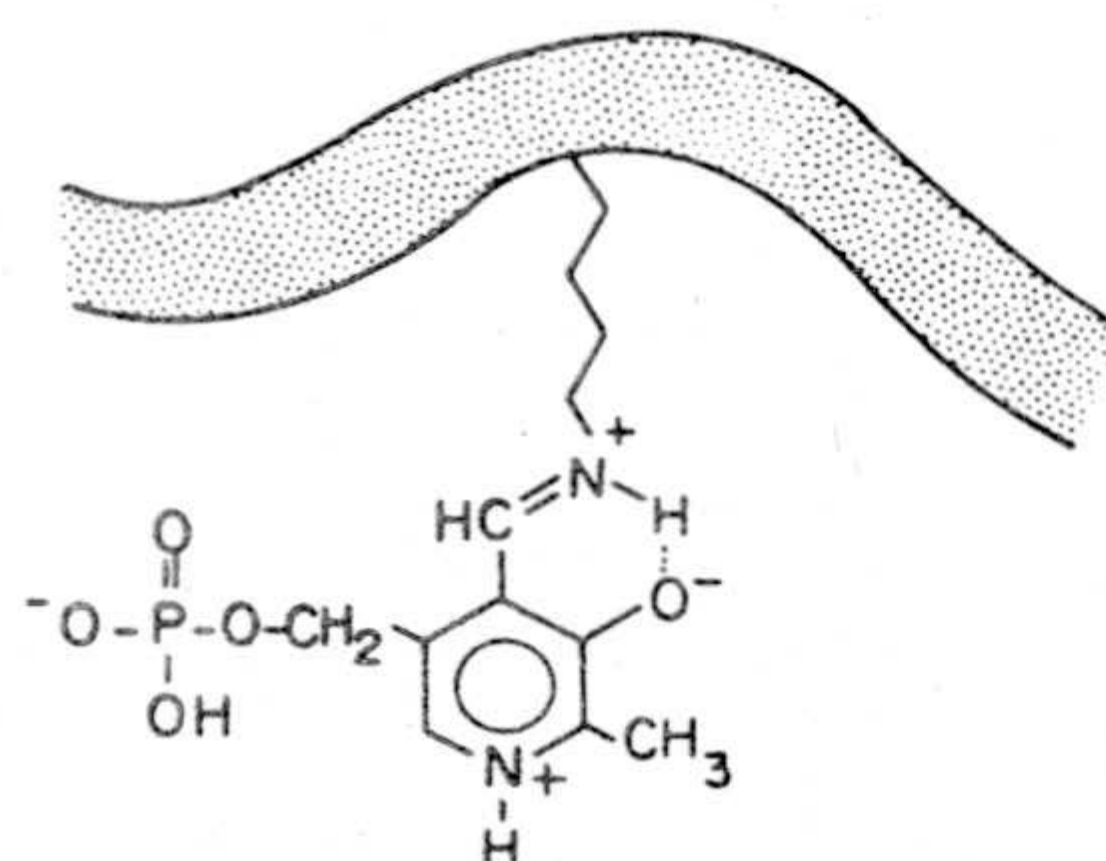
por acidificación, o por el contrario, aumentando el pH, sería posible la reducción con NaBH_4 , formándose la amina secundaria (IV), la cual también absorbe a 330 nm. Como ya hemos indicado, este derivado posee todavía el 60% de la actividad original, y la mayor parte de sus propiedades físicas y enzimáticas son indistinguibles de las de fosforilasa nativa (24,27).

Posteriormente, Cortijo et al.(28) publicaban las características de fluorescencia de la fosforilasa, la cual posee, a pH neutro, dos bandas de emisión; una a 335 nm. después de excitar a 280nm. y causada por el componente proteínico de la enzima y otra con un máximo a 535 nm. el cual, y su rendimiento cuántico, permanecen prácticamente constantes por excitación entre 330 y 450 nm. y que está asociada con el sitio del PLP en la fosforilasa. Estos autores continúan reproduciendo estas características de fluorescencia mediante el uso de bases de Schiff del PLP en medios no acuosos, obteniendo las mismas emisiones de fluorescencia a 535 nm. por excitación a 335 nm. y 415 nm, así como el mismo espectro de excitación registrado por la emisión a 535nm (29). En medios no acuosos, estas bases de Schiff del PLP presentan, también, las mismas características espectrales del sitio del PLP en la enzima. Teniendo en cuenta estos resultados, y el hecho de que los complejos que en disolución acuosa simulan las propiedades espectrales del sitio del PLP no presentan, sin embargo, las que hemos citado de fluorescencia, Shaltiel y Cortijo (29) proponían que, a pH neu-

tro, el PLP en la fosforilasa se encuentra embebido en una bolsa hidrofóbica y enlazado a la enzima mediante un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina, formando una estructura de base de Schiff con puente de hidrógeno (I).



(I)



(II)

Por medio de una disminución o aumento de pH, o bien, por desnaturalización con urea, se produciría un cambio de conformación en la enzima suficiente para "abrir" la bolsa hidrofóbica y exponer el cromóforo a la disolución acuosa con el consiguiente incremento en la absorción a 415 nm (II).

Un mayor apoyo a esta proposición era obtenido por estos autores mediante el estudio de la fosforilasa reducida con NaBH_4 (30,31) y por otros investigadores (32,33).

Más recientemente, Honikel y Madsen (34) han estudiado los espectros de absorción y fluorescencia del PLP y algunos

de sus aductos con aminas primarias en disolventes no acuosos. Sus resultados proponen una estructura carbinol amina para el sitio del PLP en la fosforilasa, y serán discutidos con más detalle en el capítulo de DISCUSION junto con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo.

Respecto a la imposibilidad de reducción de la enzima a pH 7, Shaltiel y Cortijo (29) encontraron que la reducción de los aductos de PLP con aminas primarias, en DMF, transcurría a una velocidad mucho menor que la de descomposición del NaBH_4 en H_2O . Así, si la enzima no se reduce con NaBH_4 se debería a que la velocidad de producción del agente reductor, BH_3 , y su correspondiente descomposición por el H_2O es mucho mayor que la reducción del PLP sobre la enzima. Esta velocidad es más lenta que en otras enzimas debido a que, en este caso, el cofactor estaría en una bolsa hidrofóbica que limita la cinética de reducción (29).

Los resultados obtenidos del estudio polarográfico de los aductos del PLP con aminas primarias en medios acuosos y no acuosos (35), hacían aconsejable el estudio de la reducción de la enzima y compuestos modelos más complejos, por vía electroquímica. En el capítulo correspondiente se expondrán los resultados obtenidos en este sentido.

3. Grupos funcionales. En cuanto al mecanismo de la reacción catalítica, se ha intentado su estudio desde diferentes puntos de vista. El más directo es la medida de actividad enzimática en presencia o ausencia de los múltiples efectores (alostéricos o no) o de una gran cantidad de análogos de estos, y como ya hemos dicho este laboratorio está colaborando a su estudio.

Otra forma más indirecta de abordar el problema es mediante el estudio de los diversos grupos funcionales necesarios para la actividad.

La modificación química de fosforilasa con reactivos de cisteína, resulta en la pérdida de la actividad enzimática. De un análisis cinético de la reacción, se podía concluir que la modificación química daba lugar a la inactivación de la enzima, produciéndose a continuación la disociación de la misma (5,36). Más recientemente, Madsen, Smillie et al. (37-39) han utilizado iodoacetamida como reactivo de los grupos sulfhidrilo. Sobre la base de la reactividad de los mismos, los nueve grupos -SH por monómero se pueden clasificar en tres categorías: 1) Dos grupos -SH reaccionan a una velocidad similar a la de compuestos modelos, lo que sugiere que se trata de grupos expuestos a la superficie de la enzima. La pérdida de estos dos grupos -SH tiene poco efecto sobre la estructura y actividad de la enzima. 2) Otros dos grupos -SH reaccionan mucho más lentamente que los anteriores. El bloqueo de ambos grupos resulta en la total inactivación de la enzima, así como en su disociación en monó

meros. 3) El resto reacciona mucho más lentamente, a no ser que se desnaturalice la enzima.

Puesto que se conoce la secuencia de los nueve residuos de cisteína (17,18,37), para facilitar su identificación ahora y en posteriores discusiones, se han clasificado de la siguiente forma de acuerdo con su reactividad con DTNB:

péptido nº 1.	Phe - Gly - Cys - Arg - Asp	muy rápido
" nº 2.	Lys - Ile - Cys - Gly - Gly	muy rápido
" nº 3	Ala - Cys - Ala - Phe	rápido
" nº 4	Asn - Ala - Cys - Asp - Glu	lento

El resto hasta los nueve no se ha incluido aquí ya que no se tratarán en la discusión. Su secuencia se puede encontrar en la referencia (10).

A partir de estudios cinéticos, se dedujo un mecanismo distinto de inactivación de fosforilasas a y b (37-39). En fosforilasa b, la velocidad de modificación química de los dos grupos -SH es distinta. Uno de ellos (pep. nº 4) lo hace a una velocidad que es aproximadamente la mitad del otro (pep. nº 3). La velocidad de modificación de éste ("rápido") es similar a la de disociación e inactivación de la enzima. Este resultado sugiere que la pérdida de la actividad de la enzima puede ser atribuida a la modificación de la cisteína de éste péptido. En fosforilasa a, la velocidad de disociación es más baja que la de inactivación, la cual es similar a la suma de las velocidades de modificación de ambos grupos -SH (peps. nº 3 y 4). Esto sugiere que la modificación de cualquiera de los dos tioles da lugar a una enzima inac-

tiva. Por otra parte, la reactividad de estos dos tioles es muy sensible a una alteración estructural de la enzima. En presencia de AMP, la modificación del tiol del pep. nº 4 en fosforilasa a es imposible. Así, la inactivación enzimática que se produce debe ser atribuida al tiol del pep. nº 3. La inactivación de fosforilasa b por iodoacetamida, se retarda por la presencia de AMP o de ATP. Otros autores (40) encuentran que el AMP protege a los dos tioles (peps. nº 3y4) de la reacción con DTNB. Más recientemente, se ha encontrado que el AMP protege a uno de los grupos -SH en la reacción de fosforilasa con DTNB (41). En presencia del tampón citrato de imidazol a una concentración 0,4 M., en el cual la fosforilasa b se deforma para exponer el PLP (42), la velocidad de inactivación por reacción con iodoacetamida aumenta más de dos órdenes. Bajo estas condiciones, solamente se modifica un residuo de cisteína (pep. nº 3) (43).

También ha sido demostrado que los grupos ϵ -amino de residuos de Lisina son importantes para la estructura y actividad de la fosforilasa del glucógeno. Huang y Madsen (44) mostraron que la modificación de 40-18 residuos aminoácidos de fosforilasas a o b, respectivamente, resultaba en inactivación enzimática. Por otra parte Philip y Graves (45) demostraban que la modificación de 4-5 grupos amino en fosforilasa b resultaba en una enzima inactiva. Posteriormente, Falsold et al. (46) inactivaron fosforilasa b por modificación de un grupo amino de un residuo de lisina por monómero. Finalmente, ciertos estudios de modificación de lisina (47,48)

mostraban que el bloqueo de 5-10 residuos por monómero de fosforilasa no modificaba substancialmente la estructura y actividad de la enzima, aumentando, por el contrario, la estabilidad frente a la desnaturalización.

Aunque hemos visto que un grupo -SH y un grupo amino pueden estar implicados en la catálisis de fosforilasa, no se puede decir si esos grupos están implicados directamente en el enlace del substrato o indirectamente, es decir, determinando la estabilidad de una conformación crítica. Quizá una forma de resolver la disyuntiva anterior sea mediante el uso de reactivos con tendencia preferente a reaccionar en el sitio activo. En este sentido, Anderson y Graves (49) han observado que la incubación de la fosforilasa b con bajas concentraciones de 8 - [m-(m-fluor sulfenilbenzamida)tio bencil]adenina resulta en una especie que es activa en ausencia de AMP (26%) y que no enlaza al mismo, indicando esto - que el reactivo se ha unido a la enzima en el sitio del AMP

Poco se conoce acerca de la implicación de las tirosi - nas sobre las propiedades enzimáticas de la proteína, y aun que su posible implicación en el sitio del AMP ha sido sugerida (50), no se han realizado estudios de modificación química de las mismas. Mientras se estaba escribiendo esta memoria ha aparecido una comunicación sobre modificación química de tirosinas mediante el uso de N-acetilimidazol (51).

Cualquier estudio de modificación química de una enzima requiere la utilización de condiciones extraordinariamente suaves, para evitar la inactivación por causas no controla-

das. Igualmente, las cantidades del reactivo que se ha de utilizar, han de ser las mínimas capaces de producir cambios apreciables en las propiedades de la enzima con objeto de eliminar al máximo efectos secundarios, consecuencia del exceso de reactivo, que dificultan o hacen gratuita la interpretación de los resultados.

a. Tetranitrometano. Una de las más importantes dificultades en la realización de experimentos sobre modificación química de enzimas surge del hecho de que la mayor parte de los tratamientos implican el uso de unas condiciones químicas y físicas, que si son usuales en las reacciones de la química orgánica, son insoportables para una enzima, la cual es estable dentro de unos muy estrechos márgenes de pH, temperatura, agitación, concentración, etc.

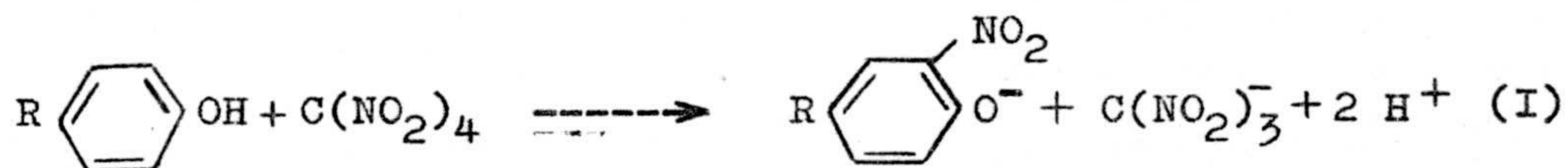
El tetranitrometano puede ser empleado, en condiciones suaves, como agente de nitración (52) y ha sido usado por diversos investigadores (53-55) para la modificación de proteínas en trabajos donde la única función utilizada para seguir la reacción con TNM eran las propiedades biológicas de la proteína en estudio. Posteriormente se ha empleado el TNM en la modificación química de aminoácidos, péptidos y proteínas, identificándose los grupos funcionales de proteínas que pueden ser modificados, productos de reacción, influencia sobre la actividad de enzimas, etc.

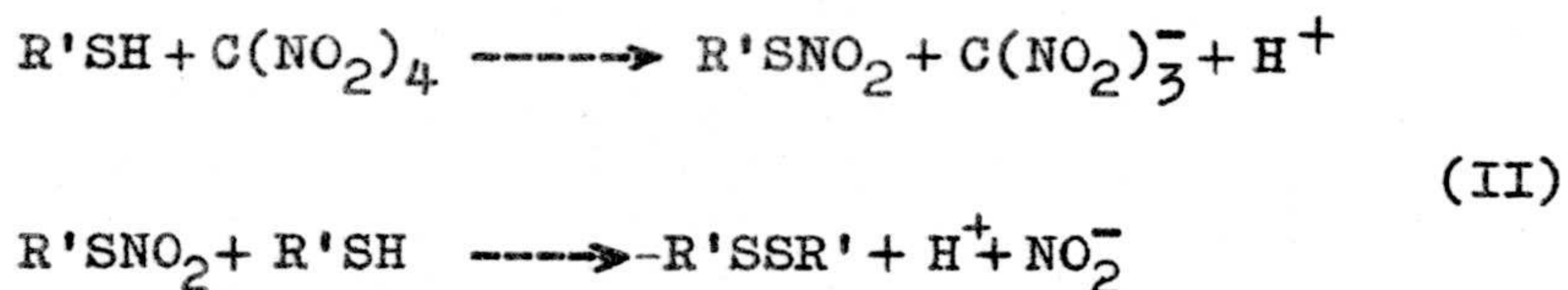
Así, trabajando con compuestos modelos, Sokolovsky et al (56) comprobaron que el TNM únicamente afecta a los aminoácidos tirosina y cisteína, no alterando a los demás, según se deduce de los resultados de nitración de una mezcla de calibrado de aminoácidos. Igualmente, se podía comprobar que la velocidad de oxidación de los grupos -SH era del orden de 10 veces superior a la de nitración de tirosinas.

Riordan et al. (57) han utilizado el TNM en la modificación química de carboxipeptidasa A, demostrando, por análisis

sis de aminoácidos, que el TNM no reacciona con más residuos que la tirosina (esta enzima no posee cisteínas). En esta enzima, un exceso molar de TNM sobre la misma de 64 da lugar a la modificación de 6,7 de los 19 grupos fenólicos que posee la carboxipeptidasa A. Los mismos autores estudiaron la modificación química de aldolasa (58) con TNM, la cual se inactivaba completamente cuando se habían modificado de 8 a 10 grupos -SH en condiciones tales que menos de un residuo de tirosina había sido modificado. Ningún otro residuo aminoácido aparecía modificado por tratamiento con TNM, como se deducía del análisis de aminoácidos. En cuanto a la reversibilidad de la oxidación de los grupos -SH, comprobaban que no era completa por incubación con M.E. Igualmente se ha tratado el pepsinógeno, la carboxipeptidasa B y la trombina(59) obteniéndose diversos grados de inactivación por incubación con TNM. También la ribonucleasa ha sido tratada con TNM por Beaven et al. , resultando en una modificación de tres residuos de tirosina en la enzima (60).

El esquema de la reacción del TNM con tirosina y cisteína según Sokolovsky et al.(56) sería probablemente el siguiente:

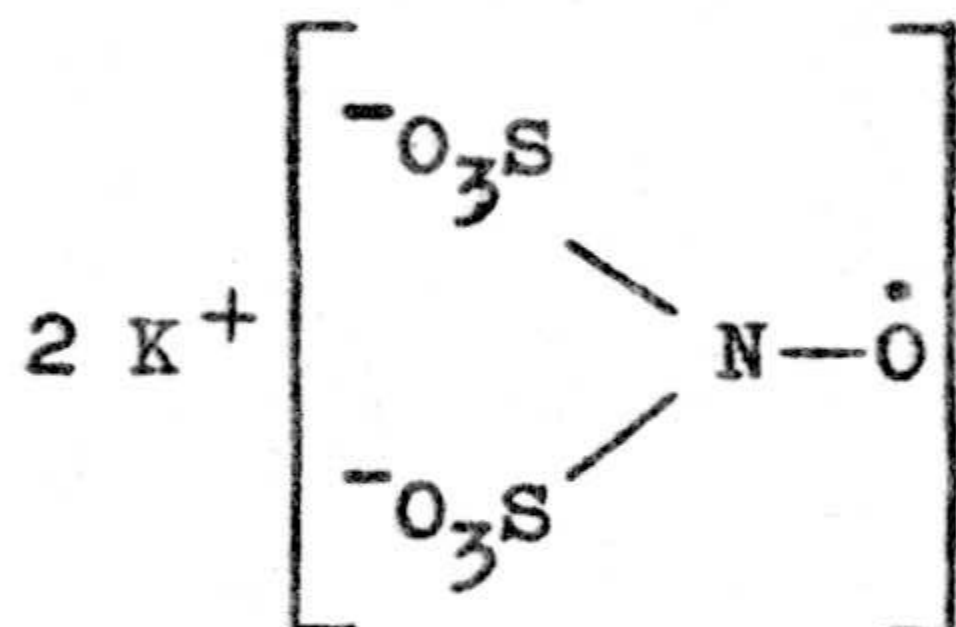




La nitrotirosina formada según la ecuación (I) presenta unas características espectrales que pueden ser utilizadas en la medida de la extensión de la reacción del TNM con enzimas. A pH alcalino, presenta una banda con un máximo a 428nm y coeficiente de extinción molar 4.100; por acidificación esta banda cambia a longitudes de onda más cortas, presentando un máximo a 360 nm. y coeficiente de extinción molar 2.790, apareciendo un punto isosbiético a 380 nm. con un coeficiente de extinción molar 2.200.

En cuanto a la segunda reacción (II), Riordan et al. (57) basándose en el hecho de que la aldolasa tratada con TNM recuperaba, solo parcialmente, su actividad original, por incubación con ME, suponían que se formaba otra especie de oxidación de los grupos -SH. Si el producto de reacción fuese, como en la ecuación (II), un disulfuro, estos autores afirman que la inactivación sería totalmente reversible por incubación con ME. Así, suponen que en un primer paso se forma un grupo R-SNO₂ como en ecuación (II). A partir de este producto pueden aparecer, bien disulfuros por reacción con un segundo grupo -SH, o bien otros productos de oxidación por reacción con iones OH⁻, como el ácido cisteico.

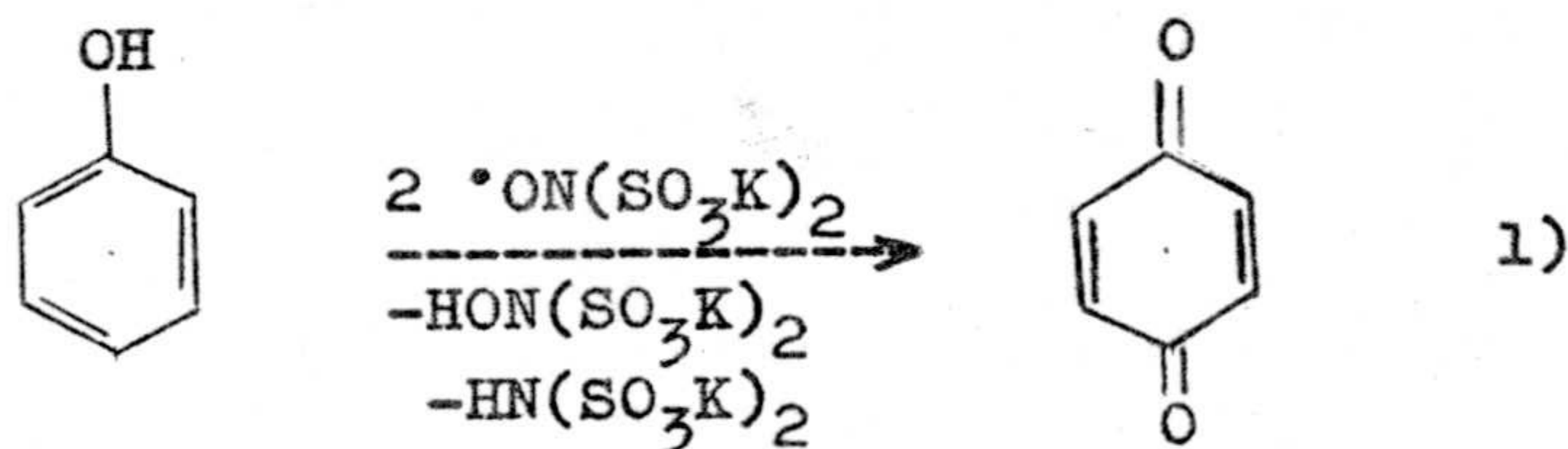
b. Sal de Fremy. La sal de Fremy, nitrosodisulfonato potásico, que en disolución acuosa es representada por la estructura:



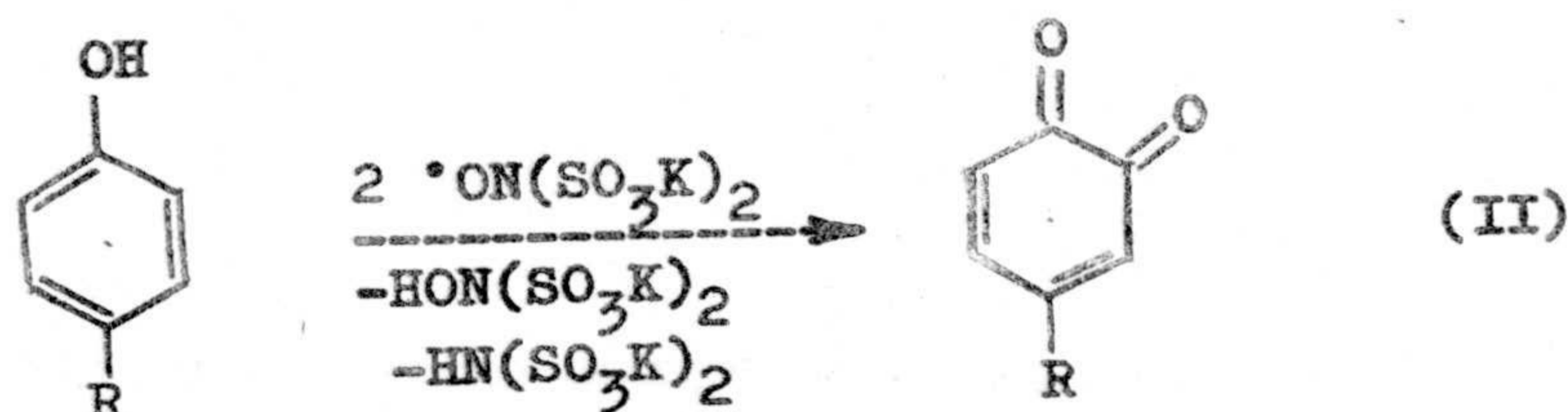
existe en estado sólido en dos formas cristalinas diferentes. Una es dimérica y la otra monomérica (61,62) y ambas forman cristales de color amarillo. En este estado es bastante inestable, sufriendo, de hecho, en algunas ocasiones, descomposiciones espontáneas. Esta inestabilidad, sin embargo, parece debida a la presencia de ciertas impurezas, (61,63) como ión cloruro, bióxido de manganeso o ión nitrato, que obligan a tomar precauciones durante su obtención.

Las disoluciones acuosas son de color púrpura y su estabilidad depende fundamentalmente del pH (61,64), siendo las disoluciones ácidas y básicas muy inestables.

La reacción de la sal de Fremy con los fenoles (65) da lugar a la formación de quinonas. Cuando la posición para al grupo OH no está substituida el producto de reacción es la para-benzoquinona. Reacción (I).



Cuando la posición para está substituida por un radical, el producto de reacción es la orto-benzoquinona, reacción (II).



Ha sido demostrado que la sal de Fremy reacciona, en disolución acuosa, con tirosina para dar lugar al correspondiente dopacromo (66). Igualmente, la sal de Fremy ha sido utilizada para modificar residuos de tirosina en proteínas (67-70).

La sal de Fremy fue elegida, entre otros reactivos, para modificar los residuos de tirosina de la fosforilasa por las condiciones generales en que se produce la reacción, convenientemente suaves. Otros reactivos presentan unas condiciones de reacción demasiado energéticas que no permiten su uso con la fosforilasa.

La sal de Fremy, además, no reaccionaba con ME ni cisteína, indicando con esto que la reaccionabilidad de los grupos -SH de fosforilasa no interferiría la interpretación de los resultados.

4. Resumen final. Resumiendo, los principales objetivos de este trabajo son:

A) Estudio polarográfico de la enzima. Aunque parece que una base de Schiff en un medio hidrofóbico puede simular algunas propiedades del PLP en fosforilasa, el hecho de que no se pueda reducir con NaBH_4 , a pH neutro, le resta credibilidad a dicho modelo. Una posible razón de esta inercia química frente al NaBH_4 ha sido aventurada, basándose en que estas bases se reducen más lentamente en medios hidrofóbicos que en agua, señalando que el agente reductor se descompondría más rápidamente, en agua, que en la reducción del PLP unido a la enzima. Sin embargo, los argumentos cinéticos pueden estar sujetos a un gran criticismo en el estudio de enzimas dado el gran número de grupos funcionales de éstas que podrían catalizar la reacción. Por ello se ha procedido al estudio del comportamiento polarográfico de la holoenzima y apoenzima, y algunos modelos entre los que merece destacarse los complejos que forma el PLP con la albúmina, y que han sido caracterizados por espectroscopía y fluorescencia.

B) Modificación de restos aminoácidos de la enzima. Respecto a este punto, conviene recordar que solo se ha realizado el estudio, casi exhaustivo, de las cisteínas y algo de lisinas. Sin embargo, nada se ha hecho respecto a las tirosinas, las cuales parecen jugar un papel preponderante en otras enzimas. Se han escogido dos reactivos bastante específicos de tirosinas, el tetranitrometano y la sal de Fremy.

EXPERIMENTAL

A continuación se describe la parte experimental de esta memoria, sin incluir resultados que se dan en el siguiente capítulo.

Este capítulo se ha dividido en dos partes:

A) MATERIALES y B) METODOS.

En MATERIALES se describen las substancias que han sido preparadas o aisladas, purificadas y caracterizadas por nosotros, así como los productos que se han comprado y su origen.

En METODOS se describen aquellos que han sido usados más o menos rutinariamente a lo largo del trabajo, con objeto de evitar su repetición iterativa en el siguiente capítulo.

A) MATERIALES

1. Obtención de fosforilasa. La fosforilasa b de músculo de conejo fue preparada según el método de Fischer et al. (71) modificado por Krebs et al. (72), y con algunas variantes in troducidas a lo largo de este trabajo. La extracción y purificación de la enzima supuso cinco etapas fundamentales, que exponemos:

a. Extracción, precipitación ácida de otras enzimas y precipitación con sulfato amónico:

Se sacrificaban los conejos necesarios para obtener dos kilogramos de músculo esquelético, manteniendo siempre en hielo el músculo extraído.

A los dos kilogramos de músculo, una vez triturados, se les añadían dos litros de agua destilada a una temperatura comprendida entre 35°C y 40°C, agitándose continuamente con una varilla de vidrio durante quince minutos.

La mezcla de extracción así obtenida se pasaba a través de un lecho de tarlatana, colocado en un embudo Buchner. El músculo era reextraído una segunda vez utilizando la misma cantidad de agua a la misma temperatura durante diez minutos y una tercera usando un litro de agua a la temperatura citada, durante cinco minutos. De esa manera, se obtenían de cuatro a cinco litros de extracto que eran pasados a través de lana de vidrio, con objeto de eliminar el exceso de grasas y lípidos en suspensión.

Todas estas operaciones se llevaban a cabo en el laboratorio, a temperatura ambiente, pero el extracto era mantenido siempre en un baño de hielo.

Para eliminar una parte de las enzimas del extracto, éste se ajustaba a pH 5,4, donde la fosforilasa aun es estable(28), mediante la adición de ácido acético; el extracto turbio era centrifugado inmediatamente a 1.800 g durante 40 minutos a una temperatura de 4-6°C. Terminada la centrifugación, y después de pasar el extracto a través de papel de filtro para eliminar algunos lípidos aún en suspensión, se llevaba a pH 6,8 por adición de bicarbonato potásico.

En la cámara fría, el extracto neutralizado era llevado al 41% de saturación con sulfato amónico para conseguir la precipitación de fosforilasa por un efecto de "salting out".

b. Diálisis del precipitado en sulfato amónico. Después de eliminar la mayor parte del sobrenadante, el precipitado era centrifugado a 13.000 g durante 20 minutos a la temperatura de 4-6°C. El material centrifugado era, entonces, disuelto en unos 70 ml de agua destilada a temperatura ambiente, y distribuido en cinco o seis tubos de diálisis de 20 cm. de longitud. Estos eran dializados contra cinco litros de tampón tris-Cl a pH 6,8 para eliminar el sulfato amónico arrastrado en la precipitación. El tampón era renovado hasta que no se detectaba la presencia de sulfato amónico mediante la precipitación con Cl_2Ba . Esta operación se hacía en la cámara fría a la temperatura de 4-6°C, durante un tiempo mínimo de 24 horas.

c. Incubación con mercaptoetanol, tratamiento a alto pH y mayor temperatura, y cristalización. La disolución dializada era incubada con ME 30 mM. a 30 °C durante una hora para proteger a la enzima de una posible oxidación de las cisteínas por el oxígeno del aire. A continuación era incubada en presencia de EDTA 0,50 mM. a 37 °C y pH 8,8 durante una hora, terminada la cual era enfriada a 5 °C y llevada a pH 7 con ácido acético; de esta forma se conseguía la precipitación de enzimas que aún acompañaban a la fosforilasa. La disolución turbia se centrifugaba, entonces, a 27.000 g durante 20 minutos a 4-6 °C. Al sobrenadante de esta centrifugación se le añadían AMP y acetato de magnesio de manera que la concentración de ambos al final era 1,0 mM. en AMP y 20 mM. en Mg^{2+}

La preparación era dejada toda la noche en un baño de hielo para que cristalizara.

d. Recristalización. La suspensión cristalina era centrifugada a 27.000 g durante 20 minutos a 4-6 °C. El material centrifugado se disolvía en unos 200 ml. de tampón tris-Cl 0,01 M., ME 0,03 M., pH 7 calentado a 37 °C. De nuevo se añadía AMP y acetato de magnesio hasta una concentración como la ya citada y se dejaba toda la noche en un baño de hielo a cristalizar.

e. Segunda recristalización. La suspensión cristalina se centrifugaba como en la etapa anterior y el material se pre

paraba de la misma forma, pero antes de añadir AMP y acetato de magnesio, la disolución se centrifugaba a 10.000 g durante quince minutos a temperatura ambiente, para eliminar la enzima desnaturalizada que pudiera haber en suspensión; a continuación se añadía AMP y acetato de magnesio y se dejaba en un baño de hielo toda la noche para cristalizar.

La enzima así preparada, mantenía su actividad durante cuatro o seis semanas, no perdiendo durante este periodo más de un 10% de su actividad original. A lo largo de este tiempo la enzima era recristalizada, aún, dos o tres veces, con objeto de eliminar la posible presencia de fracciones desnaturalizadas.

El tiempo que la enzima permanecía activa, se pudo observar que era dependiente de la cantidad de AMP presente en la suspensión; cuando la concentración de esta substancia en la suspensión no era superior a 10^{-4} M., la actividad desaparecía en más de un 50% en menos de dos semanas, mientras que manteniendo concentraciones de AMP por encima de 10^{-3} M. la actividad se mantenía durante el periodo de tiempo citado arriba.

2. Preparación de fosforilasa libre de AMP y medida de la concentración. Habitualmente se utilizaron dos procedimientos para eliminar el AMP de la fosforilasa:

a) Pasando una disolución concentrada de enzima por una columna de Sephadex G-25 de 1,5 x 25 cm.

b) Utilizando columnas de charcoal-sephadex G-25 (73).

La mezcla charcoal-sephadex G-25 se preparaba haciendo hervir durante una hora una cierta cantidad de sephadex G-25 en presencia de aproximadamente la misma cantidad en peso de charcoal. Con esta suspensión se preparaba una columna de 0,5 x 2 cm. equilibrándola a vacío con el mismo tampón a utilizar en la disolución de la enzima.

Las ventajas o inconvenientes de uno u otro procedimiento son de tipo experimental obteniéndose con ambos análogos resultados; el primero es más lento y no permite obtener disoluciones muy concentradas pero se pueden eliminar o introducir en la disolución de enzima aquello que interese; el segundo es más rápido y permite obtener disoluciones más concentradas aunque, en cambio, únicamente puede eliminar el AMP.

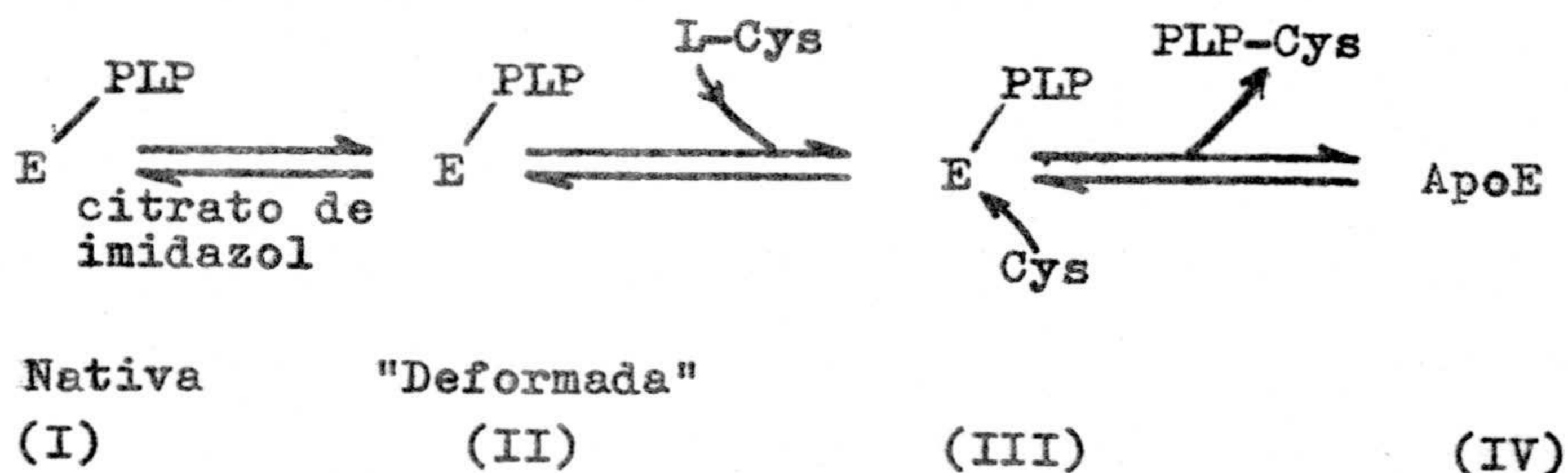
La concentración de enzima se medía una vez eliminado el AMP a partir de su absorción a 280 nm. utilizando un coeficiente de extinción de $1,32 \text{ cm}^2 / \text{mg}$. (74,75). La masa molecular de un monómero de enzima fue considerada siempre 92.500. (76).

El criterio seguido para considerar que la enzima había sido purificada de AMP fue la relación de absorbancias a 260

nm. Cuando $0,50 < Ab_{260} / Ab_{280} < 0,55$ considerábamos que se había eliminado el AMP hasta no detección espectrofotométrica.

Mientras no se diga otra cosa, se usó la enzima así preparada disuelta en tampón tris-Cl⁻ 0,05 M., EDTA 1,0 mM., - pH 7,0.

3. Preparación de apofosforilasa. El procedimiento de preparación implica dos operaciones simultáneas(77,42):



I a II : deformación de la proteína por un agente adecuado (citrato de imidazol).

III a IV : ruptura del enlace del fosfato de piridoxal a la proteína con un reactivo de aldehidos (L-cisteína).

De esta forma la reacción es totalmente reversible por incubación de la enzima con PLP. Si se utilizan procedimientos más drásticos, como acidificación o desnaturalización mediante urea, se produce una pérdida de actividad irreversible.

La resolución se iniciaba mezclando volúmenes iguales de fosforilasa libre de AMP a una concentración de 4 mg/ml. y una disolución compuesta de imidazol 0,8 M. y L-cisteína ClH. 0,2 M., ajustada a pH 6,2 con ácido cítrico a 0 °C, recién preparada. La reacción se mantenía durante 35 minutos a 0 °C y se terminaba por adición de un volumen igual de una disolución de sulfato amónico saturado. Después de centrifuga -

ción, el sulfato amónico, fosfato de piridoxal y L-cisteína, arrastrados en la precipitación, se separaban pasando por una columna de sephadex G-25.

La concentración de apoenzima se determinaba espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción $1,32 \text{ cm.}^2/\text{mg.}$

Para la determinación de fosfato de piridoxal en la holo y apoenzima, una parte alícuota se desproteinizaba con ácido perclórico hasta una concentración final 0,3 N. La concentración de fosfato de piridoxal en el sobrenadante se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción molar 6.700 a 295 nm.(78).

La apoenzima presentaba normalmente menos del 1% de actividad de la holoenzima.

Para la reconstitución, la apoenzima se incubaba con una disolución de fosfato de piridoxal 0,2 mM. a 37 °C, utilizando una concentración de la misma de 2 mg/ml. y un tiempo de 10 minutos. De esta forma se obtenía una reactivación total.

Una descripción más detallada puede encontrarse en la referencia (79).

4. Albúmina de suero de vaca. Esta proteína, cristalizada, fue obtenida de Calbiochem. Su concentración en disoluciones acuosas era medida a partir de su absorción a 280 nm. considerándose un coeficiente de extinción $6,6 \cdot 10^2 \text{ cm}^2/\text{g.}$ (80) a pH 7 y una masa molecular de 67.000 (81).

Los ácidos grasos fueron eliminados siguiendo el método propuesto por Chen R.F. (82), preparando una disolución aproximadamente al 10% de albúmina y al 5% de darco a pH 3 con ClH. Esta disolución se colocaba en un baño de hielo y se agitaba magnéticamente durante una hora. Transcurrida la hora, el darco se separaba centrifugando a 20.000 g. tres veces durante veinte minutos cada una. Terminada la centrifugación se decantaba el sobrenadante y se llevaba a pH 7 mediante NaOH.

5. Acido adenosín-5'-fosfórico, fosfato de piridoxal y tetranitrometano. El AMP se obtuvo de Fluka, su concentración en disoluciones acuosas era determinada midiendo su absorción a 259 nm.; utilizando un coeficiente de extinción molar de 15.400 a pH neutro.(83).

El fosfato de piridoxal se obtuvo de Merck. Su concentración en disoluciones acuosas se medía a partir de su absorción a 388 nm., en NaOH 0,1 M.; coeficiente de extinción molar, 6.600 (78).

El TNM se obtuvo de Fluka.

6. Preparación y purificación de sal de Fremy. Este producto, $\text{ON}(\text{SO}_3\text{K})_2$, aunque es asequible comercialmente, parece aconsejable su preparación antes de su uso por razones de estabilidad. Practicamente todos los procedimientos para su obtención están basados en la oxidación del hidroxilamindisulfonato, $\text{HON}(\text{SO}_3\text{K})_2$, en disolución alcalina. Este último compuesto es preparado fácilmente por reacción entre los iones nitrito y bisulfito (65):



llevada a cabo en un baño de hielo y procurando siempre la existencia de hielo picado en el seno de la disolución.

Como agente oxidante del hidroxilamindisulfonato se utilizó permanganato potásico añadido gota a gota durante una hora. Una vez separado el dióxido de manganeso formado, la precipitación de la sal de Fremy era conseguida mediante la adición gota a gota de una disolución saturada de cloruro potásico. Los cristales naranja se recogían en un embudo Buchner y se lavaban con cloruro potásico saturado amoniacal, metanol amoniacal y acetona. Una vez secados los cristales naranja en un vidrio de reloj, durante 10 o 15 minutos, eran almacenados en un desecador, en presencia de óxido de calcio y carbonato amónico. Condiciones bajo las cuales la sal de Fremy es estable durante varios meses.

La explosión del producto durante una de las etapas de obtención nos llevó a tomar como precauciones: 1) La presen -

cia de hielo siempre que no estuviera totalmente separado el bióxido de manganeso. 2) No dejar pasar aire en los procesos de lavado hasta la total eliminación de los iones cloruro. 3) Procurar la presencia constante de una atmósfera amoniaca - una vez cristalizado.

Antes de su uso, la sal de Fremy fue recristalizada, al menos, tres veces en una disolución de fosfato de potasio. Sus características espectrales fueron aquellas de la Bibliografía (64), presentando dos máximos a 248 nm. y 545 nm. Su concentración en disoluciones acuosas era determinada habitualmente midiendo su absorción a 545 nm. y usando un coeficiente de extinción molar de 20,08 (64). Para evitar su rápida descomposición, a pH ácido o alcalino, sus disoluciones se mantuvieron siempre a pH comprendido entre 7 y 8 donde eran estables durante varios días (75), aunque como precaución adicional nunca se usó una disolución preparada más de 24 horas.

7. Disoluciones reguladoras. Estas disoluciones fueron preparadas mediante el uso de trizma base, de Sigma; maleato sódico, de Merck; y glicerofosfato sódico, de Merck. También fue utilizado el N N^o-bis(ácido 3-etanosulfónico)piperazina, PIPES, el cual fue sintetizado a partir de 2-bromoetanosulfonato sódico, como se indica a continuación:

a. Preparación y purificación de 2-bromoetanosulfonato sódico:

Siguiendo el método de Marvel y Sparberg (84); en un matraz de fondo redondo provisto de un refrigerante de reflujo, de un agitador mecánico y de un embudo de separación, se introducían 615 g. de dibromuro de etileno, 1200 ml. de alcohol del 95% y 450 ml. de agua. Puesto en marcha el agitador, se calentaba la mezcla a ebullición. Sobre la mezcla hirviendo y sometida a una buena agitación, se añadía, por el embudo de separación, una disolución de 125 g. de sulfito sódico anhidro en 450 ml. de agua a lo largo de dos horas. Una vez añadida toda la disolución de sulfito, la disolución se hervía a reflujo durante dos horas. A continuación, se destilaban el alcohol y el bromuro de etileno. La disolución acuosa restante se ~~allevaba~~ llevaba, por evaporación, a sequedad.

El 2-bromoetanosulfonato se extraía del bromuro sódico y del sulfito sódico no transformado, con dos litros de alcohol del 95% hirviendo. Al enfriar la disolución, cristalizaba la mayor parte de la sal, empleando las aguas madres en una segunda extracción.

El rendimiento era del 70-80% del teórico. El producto

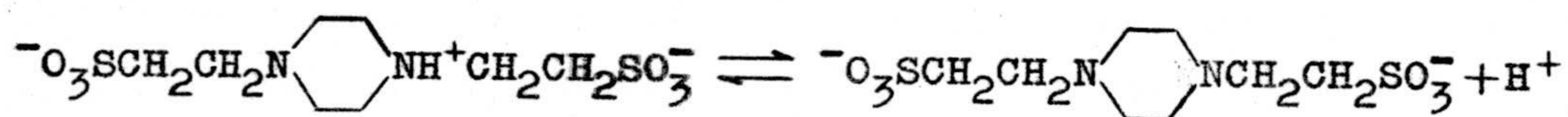
podía ser purificado aún más recristalizando en alcohol y de secando en la estufa a 110 °C.

b. Preparación y purificación de PIPES(85):

Una disolución conteniendo dos equivalentes gramo de 2--bromoetanosulfonato sódico, un equivalente gramo de piperazina hexahidratada y 60 g. de carbonato sódico era calentada a reflujo durante dos horas, manteniendo a lo largo de las mismas el pH por encima de 9-10 con NaOH concentrado. A continuación, la mezcla de reacción era enfriada y acidificada con ClH hasta pH 1,5. Inmediatamente precipitaba la forma doble zwitterion, muy insoluble .

La purificación se llevaba a cabo llevando la forma ácida a la muy soluble sal monosódica y recristalizando de nuevo la forma ácida, al menos tresveces.

Fueron calculados el pK₂, así como el equivalente de la neutralización (figuras 8 y 9):



Equivalente de neutralización calculado: 153 ± 1,5. pK₂, 6,75 ± 0,1, que están de acuerdo con los encontrados en la Bibliografía(85).

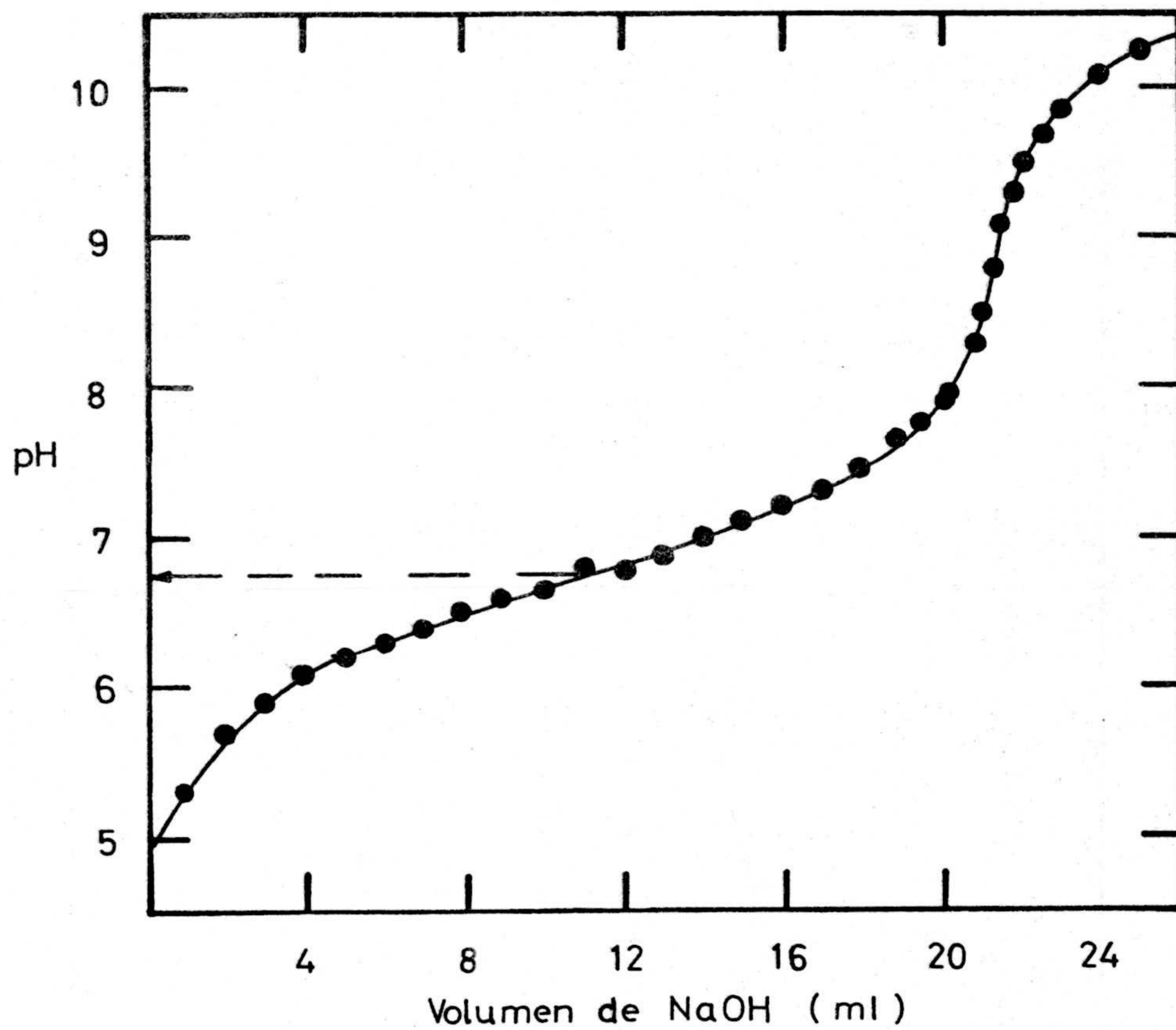


Fig. 8. Potenciometría de PIPES.

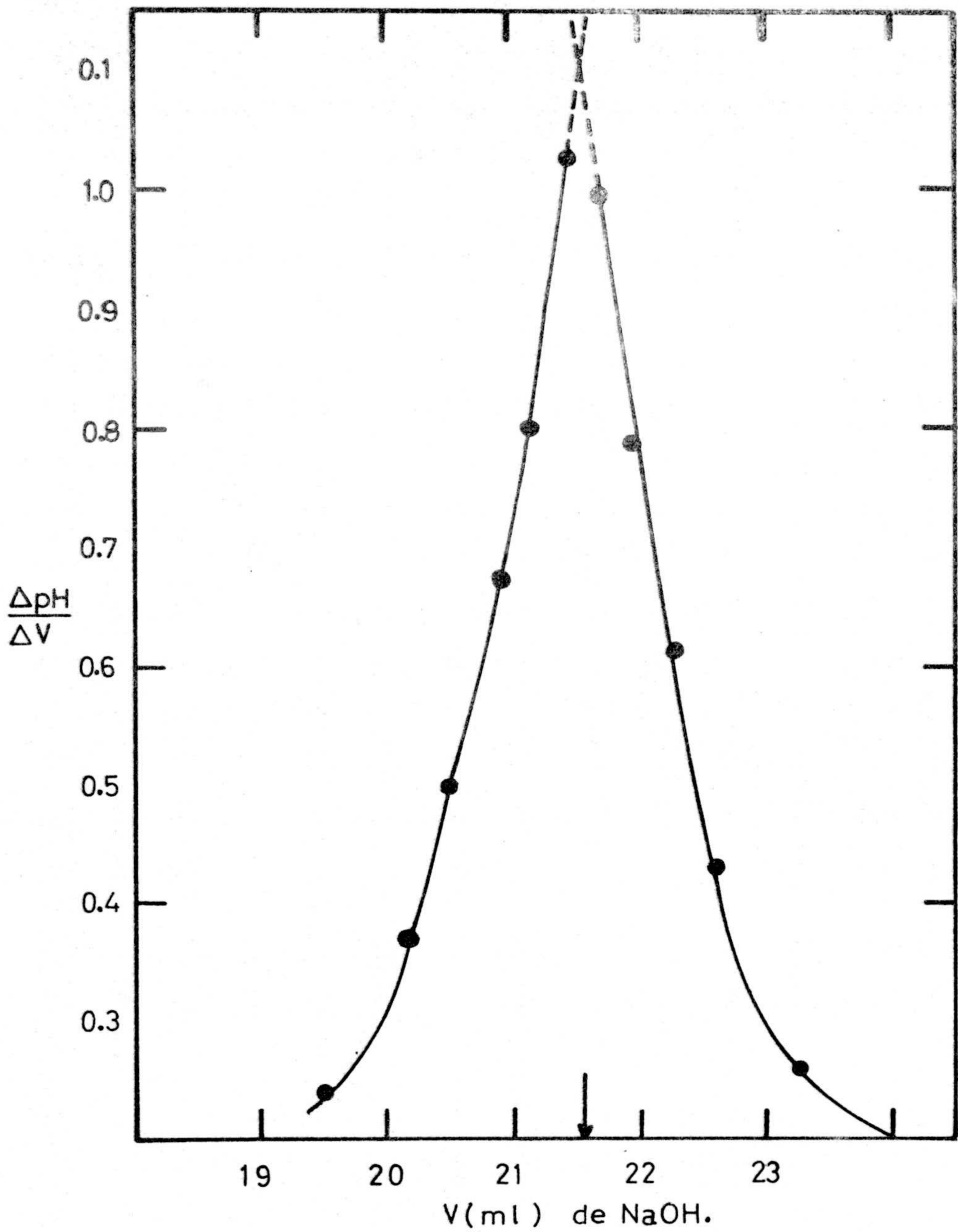


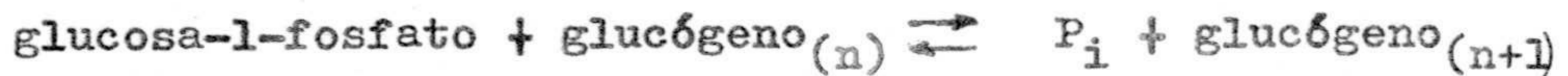
Fig. 9. Cálculo del equivalente de neutralización de PIPES.
 NaOH: 0,0096 N. PIPES: 0,0637 g

8. Otros productos. El DTNB fue obtenido de Sigma. Los productos ClH.guanidina, y glucógeno fueron también de Sigma. El EDTA, bromuro de etileno, piperazina, e imidazol fueron de la casa Fluka. Este último era recristalizado antes de su uso en acetato de etilo y secado a vacío durante toda la noche. La glucosa-1-fosfato fue de Boehringer Mannheim. El ME, ANSA y el charcoal fueron de la casa BDH. Este último producto era lavado varias veces antes de su uso con disoluciones alcalinas y agua destilada para eliminar los restos ácidos. Los productos sulfato amónico, acetato de magnesio, y molibdato amónico fueron de Merck. La L-cisteína fue de Scharlau. El sephadex se obtuvo de la casa Pharmacia. Los productos NADP, glicil-glicina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfoglucomutasa fueron de Boeringer Mannheim.

El resto de los productos utilizados fue siempre de grado reactivo.

B) METODOS

1. Medida de la actividad enzimática. Las medidas de actividad se hicieron habitualmente de acuerdo con el método de Hedrick y Fischer (25), siguiendo la aparición de fosfato inorgánico según el equilibrio:



donde n representa el número de residuos glucosídicos en el polisacárido (glucógeno).

Todos los ensayos de actividad se llevaron a cabo utilizando siempre el mismo disolvente de la enzima, cuya composición era: maleato sódico, 0,1 M.; ME, 0,04 M.; albúmina, 1mg/ml.; pH 6,5.

Como substrato se utilizó la siguiente disolución: maleato sódico, 0,1 M.; glucosa-1-fosfato, 0,15 M.; glucógeno, 2% y AMP, 2mM.; pH 6,5.

Como reactivo Parador se utilizó una disolución compuesta de 10 ml. de ácido sulfúrico, 5 N.; 100 ml. de una disolución de molibdato amónico al 2,5% y 710 ml. de agua destilada.

Como agente reductor del ácido fosfomolibdico formado - después de la adición del reactivo Parador se empleó el ANSA en medio sulfúrico (86) el cual se preparaba de la siguiente forma: 148,7 g. de bisulfito sódico, 5g. de sulfito sódico y

2,5 g. de ANSA en un litro de disolución acuosa.

Las concentraciones finales del ensayo eran las siguientes: maleato sódico, 0,1 M.; ME, 0,02 M.; albúmina, 0,5 mg./ml.; glucosa-1-fosfato, 0,075 M. ; glucógeno, 1%. ; y AMP - 1,0 mM.

La concentración de glucosa-1-fosfato utilizada da un 90 % de la velocidad máxima posible. La concentración de glucógeno (1%) es la mínima que da una velocidad máxima.

La presencia del ME es necesaria para evitar una posible oxidación de las cisteínas de la enzima. Su uso fue preferido al de cisteína para evitar cualquier posible inactivación de la enzima, ya que este producto es utilizado para separar el PLP.

La adición de albúmina es necesaria para evitar la desnaturalización superficial. Su concentración es la mínima que da una velocidad máxima(20).

El ensayo de actividad se llevaba a cabo de la siguiente forma: 0,2 ml. de enzima diluido (conteniendo de 1 a 6 μ g. de proteína) se incuban en un tubo de ensayo durante tres minutos a 30 °C. A continuación se añadían 0,2 ml. de sustrato, dejándose incubar durante 5 minutos a la misma temperatura . La reacción se paraba añadiendo 8,2 ml. de reactivo Parador, conteniendo el molibdato amónico.

El ácido fosfomolibdico liberado era determinado añadiendo 0,9 ml. de ácido sulfúrico 5 N. y 0,5 ml. de ANSA, incubando a temperatura ambiente durante cinco minutos para el desarrollo de color del azul de molibdeno.

La absorbancia de la muestra a 700 nm. era, entonces, medida en un espectrofotómetro PERKIN ELMER. Coleman 55.(84).

El ensayo en blanco consistía de 0,2 ml. de enzima, 8,2 ml. de reactivo Parador y 0,2 ml. de substrato, en este orden, y a continuación, como se ha descrito.

Las lecturas de absorbancia a 700 nm. eran convertidas en μ moles de fosfato liberado por minuto y por mg. de proteína, después de hacer una recta patrón con fosfato inorgánico, fig. 10, utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{D.O.}_{700} \cdot 10^4}{3640 \cdot t \cdot \text{mg.}}$$

donde:

D.O.₇₀₀: densidad óptica a 700 nm.

3640: pendiente de la recta correspondiente al patrón de fosfato (para un tiempo de desarrollo de color igual a 5 minutos).

t: tiempo de incubación (habitualmente 5 minutos).

mg: mg de proteína presentes en el ensayo de actividad

Las unidades de actividad así calculadas vienen expresadas como μ moles de fosfato liberado por minuto y mg de proteína.

Todas las preparaciones utilizadas, tenían una actividad específica de 80 a 100 unidades. El ensayo resultaba preciso dentro del $\pm 5\%$.

La actividad de la enzima, a veces, también fue seguida en el sentido de la degradación del glucógeno(87):

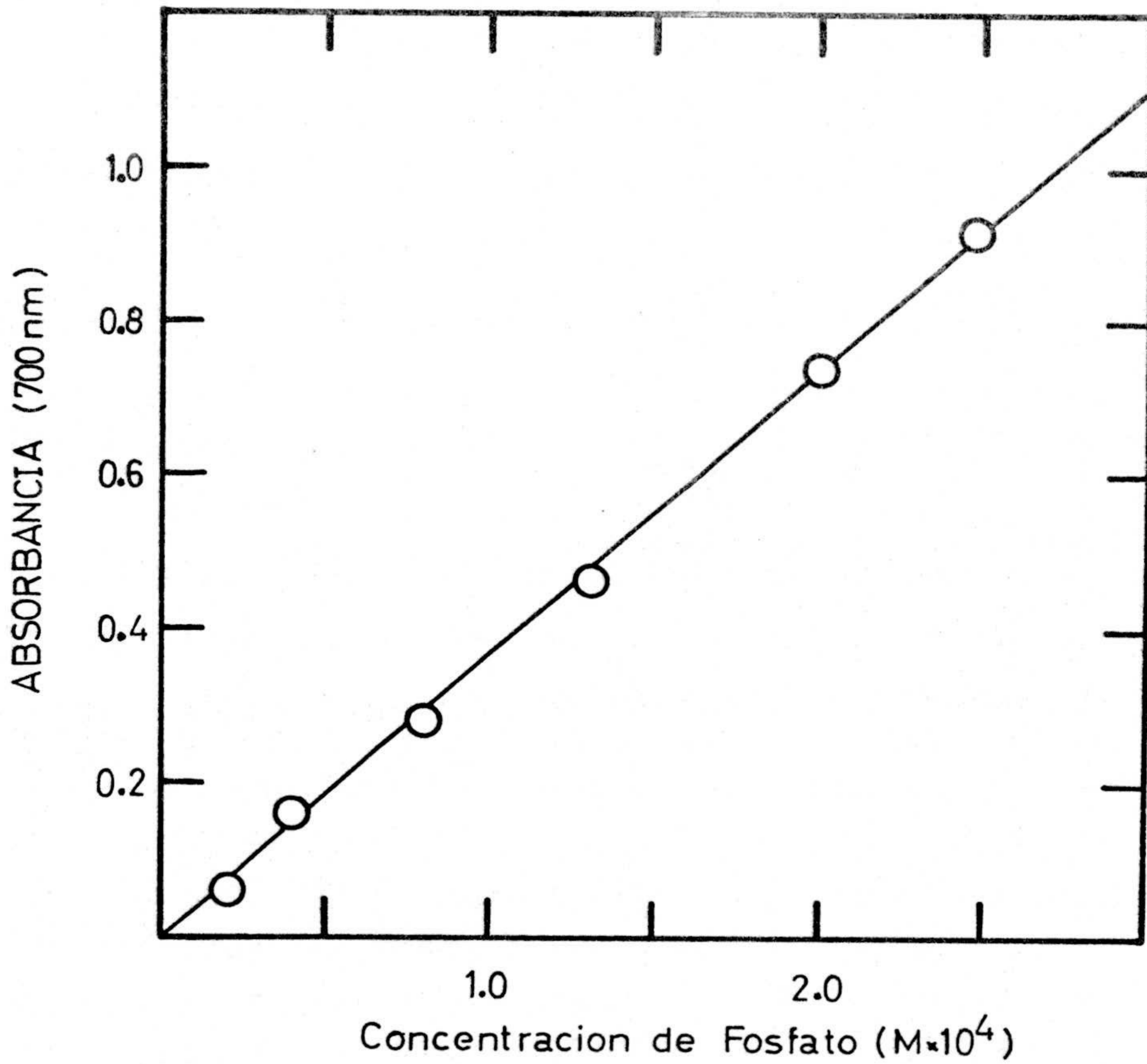
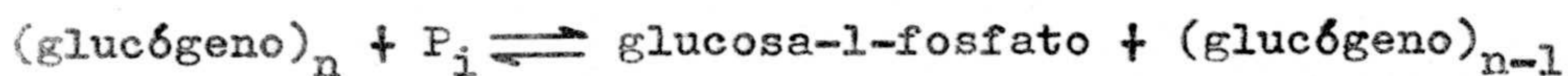


Fig. 10. Recta patrón del ensayo de actividad de fosforilasa, siguiendo la aparición de fosfato.



En la presencia de fosfoglucomutasa, la glucosa-1-fosfato es convertida en glucosa-6-fosfato y ésta es oxidada en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa simultáneamente con la reducción de NADP en NADPH, siguiéndose el incremento de absorción a 340 nm.

A continuación se da el esquema seguido:

Composición de la disolución a emplear	concentración final
a) 23 mg. de glucógeno	2,5%
b) 0,2 ml. de fosfato de potasio 0,6 M. pH 6,9	$1,2 \cdot 10^{-2}$ M.
c) 0,1 ml. de acetato magnésico 1 M.	10^{-2} M.
d) 4,5 mg. de NADP	0,5 mg/ml.
e) 8,7 ml. de Gly-Gly, pH 6,9	$5 \cdot 10^{-2}$ M.

La medida de la actividad se hacía midiendo a 340 nm. la variación de la absorbancia con el tiempo de una disolución que contiene:

0,8 ml. de la disolución anteriormente descrita.

1,0 μ l. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

1,0 μ l. de fosfoglucomutasa.

1,0 μ l. de AMP, inicialmente 0,1 M.

0,2 ml. de fosforilasa b en Gly-Gly (conc. aprox. 0,1 mg/ml)

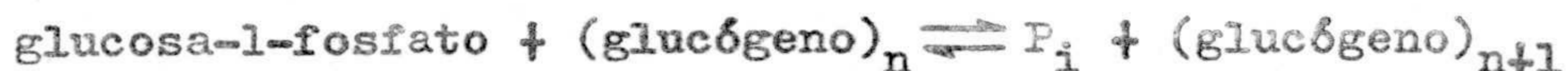
Midiendo a 28 °C., la actividad viene dada por la expresión:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{min. mg. } 6,22}$$

siendo el coeficiente de extinción del NADPH = $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

Igualmente, la actividad de la enzima fue medida siguiendo el método descrito por Palter et al. (88), para comprobar su correlación con los métodos descritos antes.

En el equilibrio ya citado:



la glucosa-1-fosfato y el fosfato inorgánico exhiben diferentes valores de pK. Los pK del fosfato en la glucosa-1-fosfato son 2 y 6,51, mientras que el fosfato libre presenta los valores de 2; 7,19; y 12. En el transcurso de la reacción, pues, se produce un cambio de pH debido a la formación de un grupo ionizable de pK 7,19 sobre el fosfato libre, a partir de un grupo ionizable de pK 6,51 sobre la glucosa-1-fosfato. Según esto, es posible realizar un ensayo potenciométrico basado en el cambio de pH durante la reacción. En el desarrollo de la misma, la velocidad de adición de ácido por un "pH-stat", necesario para mantener el pH constante se puede relacionar cuantitativamente con la velocidad de formación de fosfato.

En todos los casos existió una buena correlación entre los tres métodos utilizados, siendo el primero, descrito con más detalle, el que fue usado de una forma rutinaria.

2. Polarografía. Se ha utilizado un polarógrafo Radiometer, modelo P04. El electrodo de referencia era siempre el de calomelanos saturado. Para evitar el gasto de grandes cantidades de albúmina y fosforilasa, se diseñó una célula de medida para el polarógrafo, con la que se podía trabajar usando pequeñas cantidades, del orden de 1,5 ml, frente a los 20 ml. usuales en los trabajos polarográficos, poniéndose a punto la célula mediante la medida de disoluciones de iones Cd^{2+} ; figura 11.

La temperatura a la que se hicieron todas las medidas fue de $25 \pm 0,5$ °C., salvo cuando se indique otra cosa. El oxígeno era eliminado burbujeando nitrógeno a través de la disolución, y para evitar la formación de espumas, las muestras era preparadas con tampones previamente liberados de oxígeno, de forma que el tiempo y flujo de la corriente de nitrógeno se reducían al mínimo.

Los complejos albúmina-PLP eran preparados a la concentración adecuada para la formación de los mismos, 24 horas antes de su medida, a temperatura ambiente.

Salvo cuando se indique otra cosa, como electrolito fondo se utilizaron disoluciones de ftalato ácido de potasio, fosfato potásico, y carbonato potásico ajustadas a una concentración final 0,05 M., a los pH adecuados a los correspondientes pK

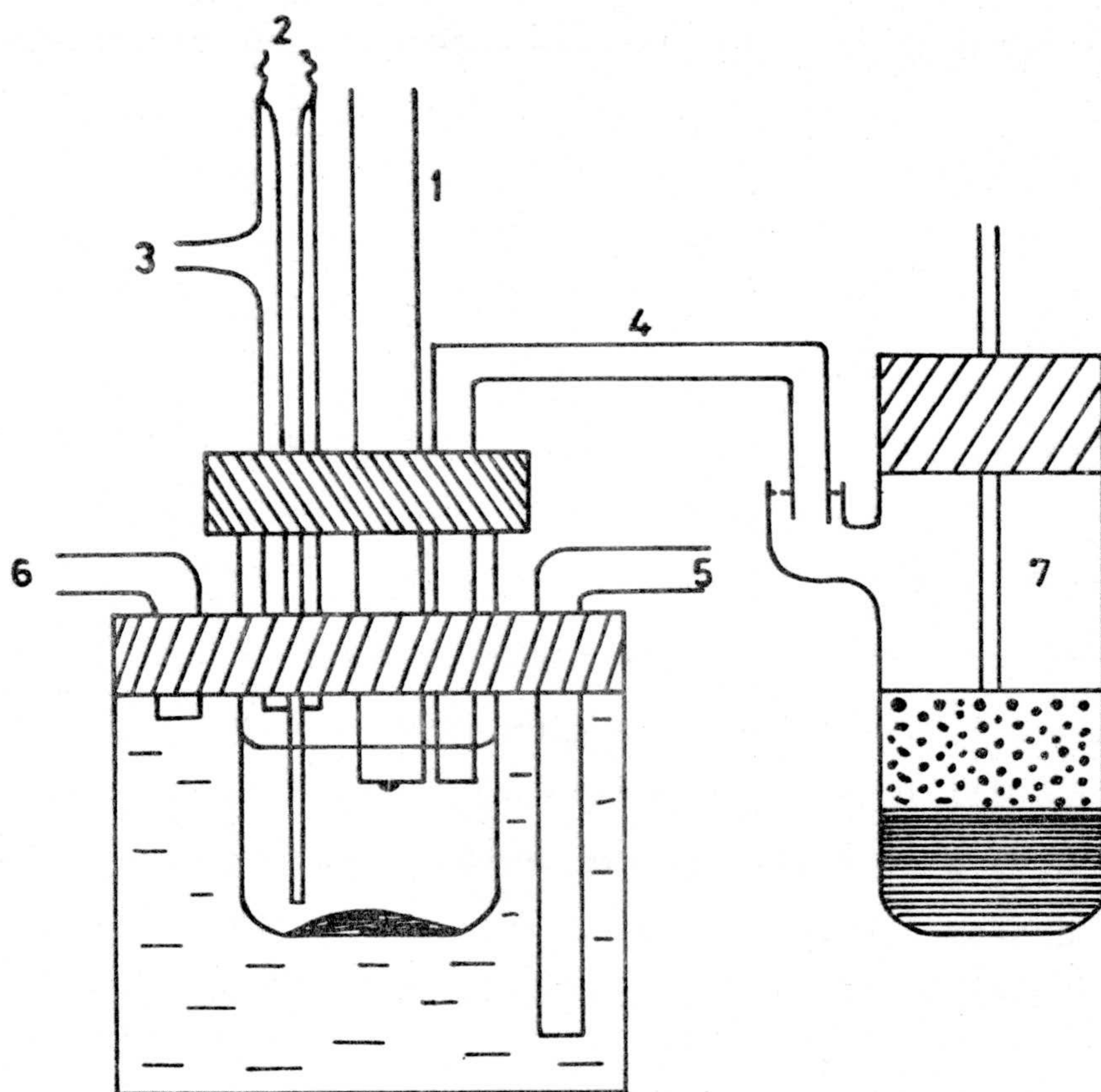


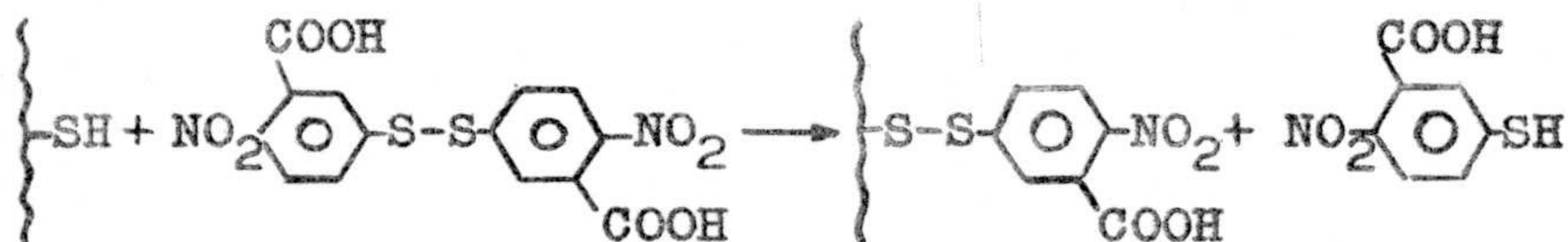
Fig. 11. Esquema de la célula polarográfica utilizada

- 1.- electrodo de gotas de mercurio.
- 2.- entrada de N_2
- 3.- salida de N_2
- 4.- puente salino
- 5.- entrada circuito de termostatación
- 6.- salida " "
- 7.- electrodo de calomelanos saturado

Dimensiones reales: las del esquema aproxte.

3. Espectroscopia. Para los espectros de absorción visible y ultravioleta se utilizó un espectrofotómetro Beckman , modelo 25, y un Perkin Elmer, modelo Coleman 55. Según las - necesidades de cada experimento se utilizaron células de 1,0 mm., 2,0 mm., 5,0 mm., 10 mm., 20 mm., 50 mm. y 100 mm. de paso de luz. En todos los casos en que se utilizó el sistema de doble haz, una célula de referencia era utilizada - conteniendo todos los componentes que la de muestra, menos - aquel que interesaba medir.

4. Valoración de cisteínas. Como reactivo de los grupos -SH se utilizó DTNB. El esquema de la reacción de este producto con los restos de cisteína de la fosforilasa es el siguiente:



Los grupos -SH valorados podían ser recuperados mediante incubación con un exceso de ME.

La reacción se llevaba a cabo normalmente utilizando un exceso de DTNB de 50 a 100 veces sobre la concentración molar de fosforilasa, y la extensión de la misma se seguía midiendo la absorbancia a 412 nm., de acuerdo con el procedimiento descrito por Ellman(89). El tampón utilizado, salvo cuando se indique otra cosa, fue tris-Cl⁻ 0,05 M., pH 7.

El número de grupos -SH por monómero de enzima era calculado mediante la siguiente expresión:

$$n^{\circ} \text{-SH/mno.} = \frac{\text{D.O.}_{412}}{13.600 \text{ [fosf.]}}$$

donde:

D.O.₄₁₂ : absorbancia a 412 nm.

13.600: coeficiente de extinción del ácido 5-tiol-2-nitro

benzoico.

[fosf.]: concentración molar de fosforilasa.

Cuando se trataba de obtener el número total de grupos -SH presentes en la enzima, se hacía la valoración en presencia de altas concentraciones de guanidina, con objeto de que todos los grupos -SH estuvieran "expuestos" al reactivo, como se puede apreciar en el capítulo de RESULTADOS.

5. Reacción con TNM. Los experimentos de modificación química de fosforilasa con TNM se llevaron a cabo habitualmente añadiendo alícuotas del reactivo 0,84 M. en etanol del 95%. La determinación del número de nitrotirosinas se realizó utilizando las características espectrales que hemos citado en antecedentes bibliográficos. El exceso de reactivo, así como los iones nitroformiato formados eran eliminados pasando por una columna de sphadex G-25. Estos últimos iones $C(NO_2)_3^-$, absorben fuertemente a 350 nm. ($\epsilon = 14.400$), sin embargo, su utilización en la medida de la extensión de la reacción del TNM con proteínas se hace difícil como consecuencia de una posible descomposición del mismo(56) catalizada por la molécula proteica que da lugar a una aparición de iones nitroformiato no controlada por la estequiometría de la reacción estudiada.

El número de nitrotirosinas se calculaba mediante el uso de la expresión:

$$\frac{\text{nº nitrotirosinas}}{\text{monómero}} = \frac{D.O.428}{4.100 [\text{fosf.}]}$$

donde:

D.O.₄₂₈: absorbancia a 428 nm. en medio alcalino

4.100 : coeficiente de extinción(56)

[fosf.] : concentración molar de fosforilasa

Cuando se calculó el número de iones nitroformiato, se utilizó un coeficiente de extinción molar $\epsilon_m = 6.500$ a 380 nm.

6. Reacción con sal de Fremy. Las reacciones implicando el uso de sal de Fremy se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando tampón tris-Cl⁻, 0,05 M.; EDTA, 1,0 mM.; pH 7,5. Excesos de reactivo sobre la concentración molar de fosforilasa de 1 a 10 se utilizaron habitualmente, mientras no se indique otra cosa, con objeto de evitar unas condiciones excesivamente enérgicas que dieran lugar a la oxidación de otros restos aminoácidos. La concentración de fosforilasa fue siempre de $1 \cdot 10^{-5}$ M. a $1,5 \cdot 10^{-5}$ M., mientras no se indique otra cosa.

Las medidas de actividad eran realizadas tomando alícuotas de la mezcla de reacción a los tiempos requeridos y diluyendo las mismas con un gran exceso de disolución, adecuadamente preparada, para medir actividad.

El número de tirosinas que habían sido modificadas fue evaluado mediante espectroscopía diferencial. Igualmente, se realizó análisis de aminoácidos, llevados a cabo amablemente en el departamento de Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidín, utilizando un analizador de aminoácidos tipo GIC-6 AH, marca JEOL.

El aminoácido tirosina, libre, se determinó a partir de su coeficiente de extinción molar a 275 nm., $\epsilon = 1475$ (90).

7. Filtración con gel de sephadex. Esta técnica fue utilizada fundamentalmente bajo dos aspectos:

a) De una forma rutinaria para la eliminación de AMP de fosforilasa, como ya se ha citado anteriormente. Igualmente, todas las reacciones que implicaban la modificación química de la enzima con la consiguiente formación de productos de reacción y presencia de exceso de reactivo utilizado, determinaron la utilización de esta técnica para obtener siempre una disolución de enzima, modificada o no, libre de impurezas. En estos casos se utilizaron siempre columnas de 1,5 x 25 cm. de sephadex G-25 o 2 x 25 cm. de sephadex G-10.

Se tomaron todas las precauciones que son habituales de esta técnica respecto de la preparación del gel por ebullición en suspensión acuosa durante el tiempo adecuado, formación de las columnas, renovación periódica de las mismas, etc. Como eluyentes se utilizaron en cada caso disoluciones reguladoras convenientemente preparadas según el tipo de experimento. La determinación de las muestras eluidas se realizaba midiendo la absorbancia de las mismas a 278 nm.

b) Para la estimación de la fijación de AMP por fosforilasa. Una mezcla en disolución de proteína (A) y la molécula pequeña (B) cuya fijación a aquella se quiere medir, se aplica a una columna equilibrada con un eluyente que incluye a la molécula pequeña en la misma concentración que en la disolución de proteína. La formación del complejo viene indicada por un seno en la curva de elución. La cantidad de B que se enlaza a A viene dada por la siguiente expresión:

$$(Q_B) = \int_{v'}^{v''} (\bar{c}_B - c_B) dV \approx (\bar{c}_B - c_B) \Delta V$$

Donde:

(Q_B) = cantidad de B que se enlaza a A

\bar{c}_B = concentración de B en el eluyente.

c_B = concentración de B en una fracción de elución comprendida entre v' y v''

v' y v'' = volúmenes de elución antes y después de la aparición del seno.

En definitiva, la cantidad de B que se enlaza a A vendrá dada por el área del seno que aparece en la curva de elución.

En la figura 41 se da un ejemplo de las curvas de elución obtenidas.

Una extensa bibliografía sobre estos aspectos de la utilización del gel de sephadex aquí citados, así como referida a otras aplicaciones prácticas de su uso, se puede encontrar en Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry - (91), así como en los catálogos de la casa Pharmacia.

8. Análisis de datos cinéticos. Los resultados de las ci néticas seguidas midiendo la variación de la absorbancia en función del tiempo, eran ajustados a ecuaciones correspondientes a reacciones de pseudo primer orden:

$$v = - \frac{d C_f}{d t} = K \cdot C_f \cdot C_R \quad (I)$$

donde:

C_f = concentración molar del residuo que se modifica

C_R = concentración molar del reactivo usado en la modificación.

Si C_R es suficientemente mayor que C_f , se puede suponer que permanecerá constante a lo largo de la reacción, entonces, $v = - K' \cdot C_f$, donde $K' = K \cdot C_R$, de esta forma (I) será:

$$\frac{d C_f}{d t} = - K' \cdot C_f \quad \text{e integrando:}$$

$$\ln(C_f)_t = \ln(C_f)_0 - K' \cdot t \quad \text{y teniendo en cuenta}$$

que $(D.O._\infty - D.O._t) = \epsilon \cdot (C_f)_t$ donde:

$D.O._\infty$ = densidad óptica correspondiente a tiempo infinito

$D.O._t$ = densidad óptica correspondiente a tiempo t .

(lo que quiere decir que se supone nula la concentración de residuo sin modificar, a tiempo infinito); quedará:

$$\ln (D.O._\infty - D.O._t) = \ln D.O._\infty - K' t$$

Representando graficamente $\ln (D.O._\infty - D.O._t)$ vs. t obteníamos rectas de cuya pendiente se obtenía la constante K'

(min.^{-1}), y de ésta, K ($\text{min.}^{-1} \text{ M.}^{-1}$) al dividir por la concentración de reactivo en exceso. De la intersección con el eje de ordenadas se obtenía el valor de $\ln D.O._{\infty}$ del cual, conocida la constante ϵ (coeficiente de extinción molar del cromóforo modificado), se obtenía C_f , y de la relación:

$$\frac{C_f}{[\text{fosf.}]}, \text{ el número de residuos modifica-}$$

dos en el tratamiento correspondiente.

Cuando se obtenían dos cinéticas, la más lenta se extrapolaba a $t = 0$; la constante de velocidad correspondiente a la más rápida se determinaba de la recta resultante de restar a las absorbancias reales, las correspondientes a la cinética lenta.

9. Fluorescencia. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer. La temperatura fue de 30 °C., y la absorción de la muestra utilizada fue siempre inferior a 0,05 con objeto de eliminar la posibilidad de un efecto de filtro interno.

R E S U L T A D O S

Este capítulo se ha dividido en tres partes: A) B) y C).

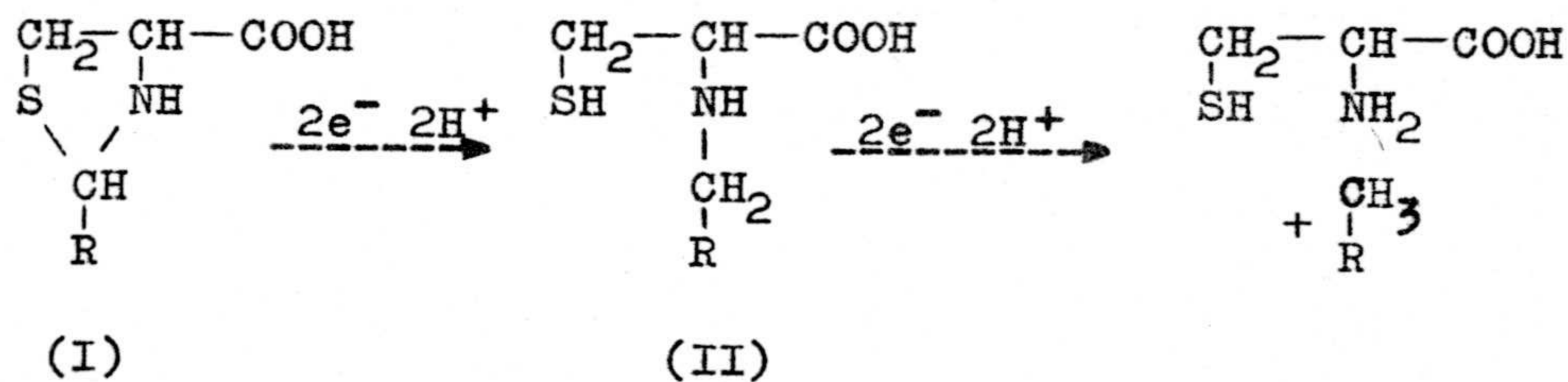
En la parte A) se describen los resultados de la espectroscopía de los modelos utilizados para simular el sitio del PLP en fosforilasa, así como los de polarografía de los mismos y de la enzima.

En las partes B) y C) se exponen los resultados de la modificación química de la fosforilasa mediante el uso de TNM y sal de Fremy respectivamente.

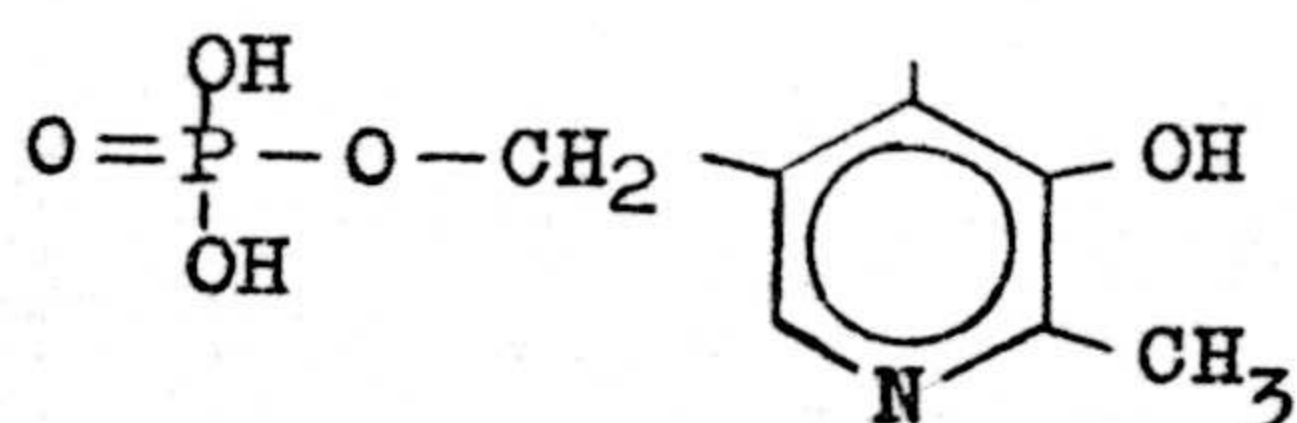
A) ESPECTROSCOPIA Y POLAROGRAFIA

1. Polarografía del complejo PLP-cisteína. La polarografía de este complejo, a la concentración $4,5 \cdot 10^{-4}$ M., se realizó en medio acuoso utilizando como tampón una disolución de fosfato 0,2 M., pH 7, que a su vez servía como disolución fondo.

Como se puede apreciar en la figura 12, el resultado fue la aparición de dos ondas a potenciales de onda media -0,74 y -1,38 volts. La primera de estas ondas es atribuida a la hidrogenolisis del enlace C-S (92). La segunda onda debería ser atribuida a la hidrogenolisis del enlace C-N en la sustancia (II), formada electrolíticamente en la superficie del electrodo a partir de la sustancia (I). El curso de la reducción seguiría, entonces, el siguiente esquema:



donde R =



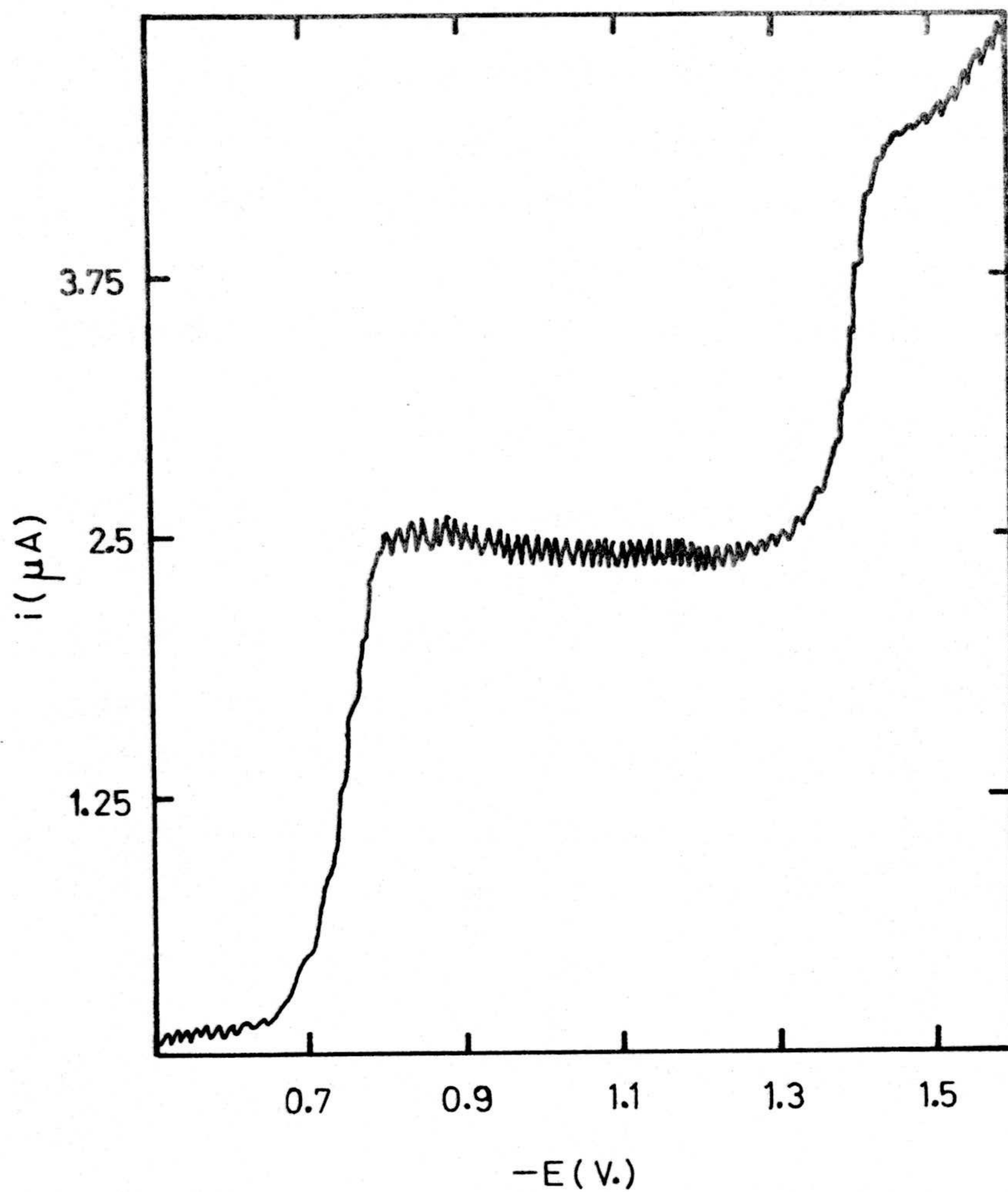


Fig. 12. Polarograma del complejo PLP-cisteína,
en medio acuoso, pH neutro.
PLP, $4,5 \cdot 10^{-4} M$.

En DMF aparecen también dos ondas a potenciales mucho - más negativos (figura 13) , de -1,39 y -1,61 volts., respectivamente. Sin entrar en más detalles sobre el mecanismo de dicha reducción polarográfica, los resultados son los esperados del conocido efecto de la polaridad del disolvente sobre el potencial de onda media (93).

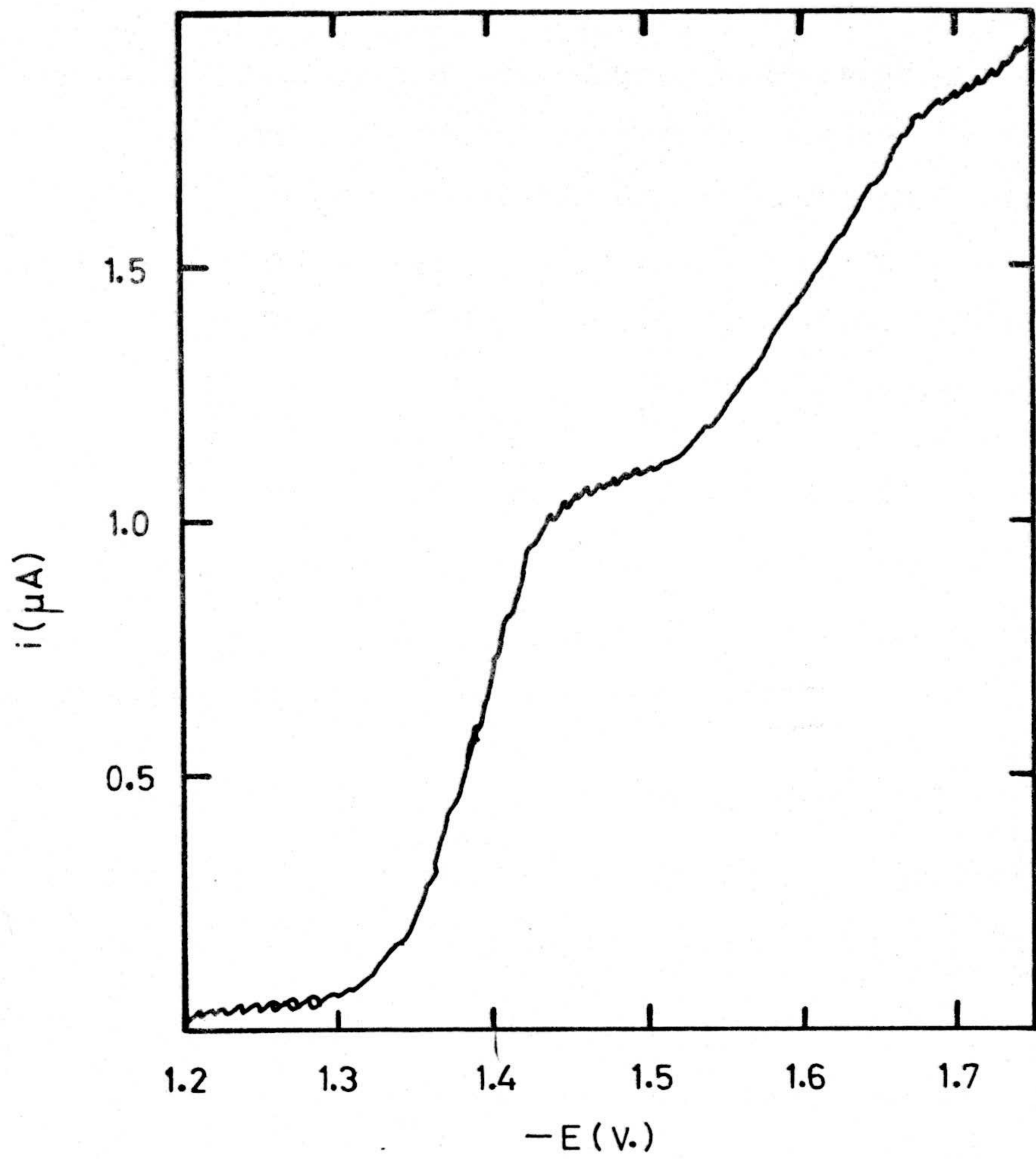


Fig. 13. Polarograma del complejo PLP-cisteína, en DMF.

2. Polarografía del complejo PLP-albúmina.

Primeramente se procedió a caracterizar los complejos formados por el PLP y la albúmina. Para ello se realizaron estudios por espectroscopía y fluorescencia que se detallan a continuación.

a) Espectroscopía. De acuerdo con los trabajos de Christensen, el PLP se une a la albúmina, a pH neutro, en varios sitios específicos (80, 94). Hasta una relación molar PLP/albúmina = 1, existe un sitio que denomina I. Hasta una relación molar PLP/albúmina = 2, existe otro sitio que denomina II; para pasar a multitud de sitios a relaciones molares superiores.

Aunque la estequiometría y los espectros de absorción de estos complejos albúmina-PLP están descritos en los trabajos de Christensen, se han repetido aquí con el objeto de situarnos en las condiciones experimentales óptimas para la formación de los mismos antes de su estudio de reducción polarográfica.

Los complejos PLP-albúmina, I y II, se prepararon mezclando disoluciones de albúmina y PLP en tampón de fosfatos a pH 7, de forma que la relación molar era 1:1 y 2:1 PLP/albúmina, respectivamente. La reacción era total a las 24 horas de haber preparado las muestras, a temperatura ambiente, y solo entonces se hizo espectroscopía de las mismas.

Como se puede observar en la figura 14, el compuesto adsorbido al sitio I, presenta dos bandas de absorción con máximos a 335 nm y 415 nm. La segunda banda, a 415 nm, es muy pe-

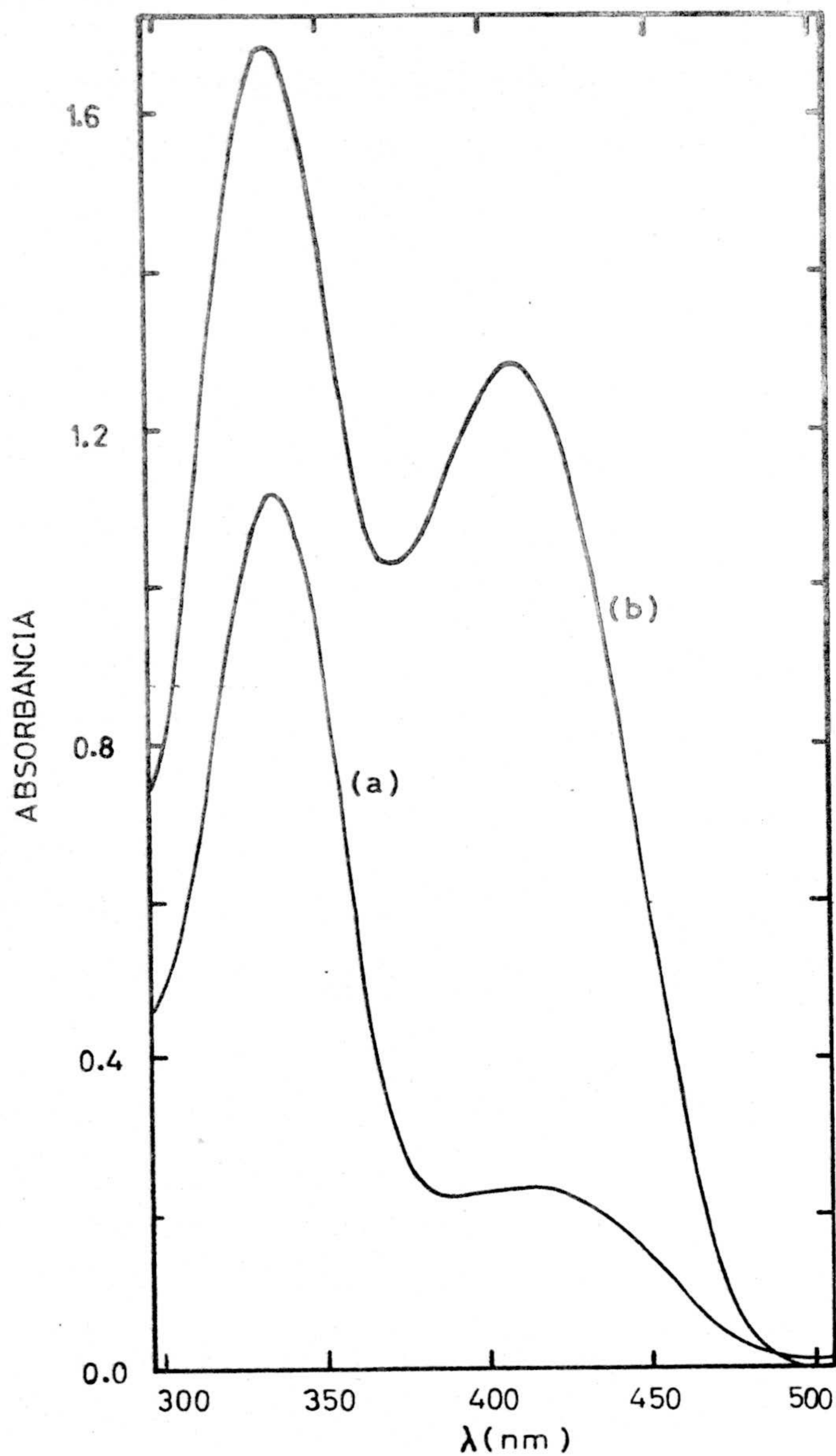


Fig. 14. Espectros de absorción de los complejos PLP-albúmina.
 (a) relación molar PLP/albúmina = 1 (sitio I).
 (b) " " " = 2 (sitio II).
 albúmina, $3 \cdot 10^{-4}$ M.; pH: 7 en tampón de fosfato 0,05M
 en la célula de referencia había albúmina $3 \cdot 10^{-4}$ M.

queña en comparación con aquella de 335 nm. En las condiciones en que se realizaba el experimento no se detectaba la presencia de PLP libre en la disolución.

Cuando la relación molar PLP/albúmina, es 2:1, se produce un gran incremento de la banda de 415 nm, mientras sigue apareciendo la de 335 nm. En la figura 15 se puede observar el espectro de diferencias entre los compuestos adscritos a los sitios II y I. Igual que para el complejo I, tampoco en este caso parece que exista PLP libre, aunque ahora esta afirmación es muy problemática, debido a que el PLP libre presenta un máximo de absorción a 390 nm en estas condiciones, demasiado cerca de la banda del sitio II para poder detectar pequeñas cantidades de PLP en equilibrio.

La estequiometría de la reacción, fue verificada mediante una valoración de albúmina con PLP siguiendo el aumento de absorbancia a 335 nm y a 415 nm. Esta valoración se repitió varias veces, formándose el complejo a concentraciones de albúmina del orden de 10^{-4} M, siendo diluidas a las 24 horas para efectuar la valoración a concentraciones del orden de 10^{-5} M en fosfatos 0,1 M, pH 7. En la figura 16 se da el resultado de una de estas valoraciones. Como se puede observar, a una relación molar PLP/albúmina = 1 se produce un cambio brusco en la absorción a 415 nm que se puede interpretar como consecuencia de que a partir de esta relación molar PLP/albúmina = 1 comienza a formarse el compuesto adscrito al sitio II.

Coincidiendo con el aumento brusco en la absorbancia a 415 nm para una relación molar PLP/albúmina = 1, también se pue-

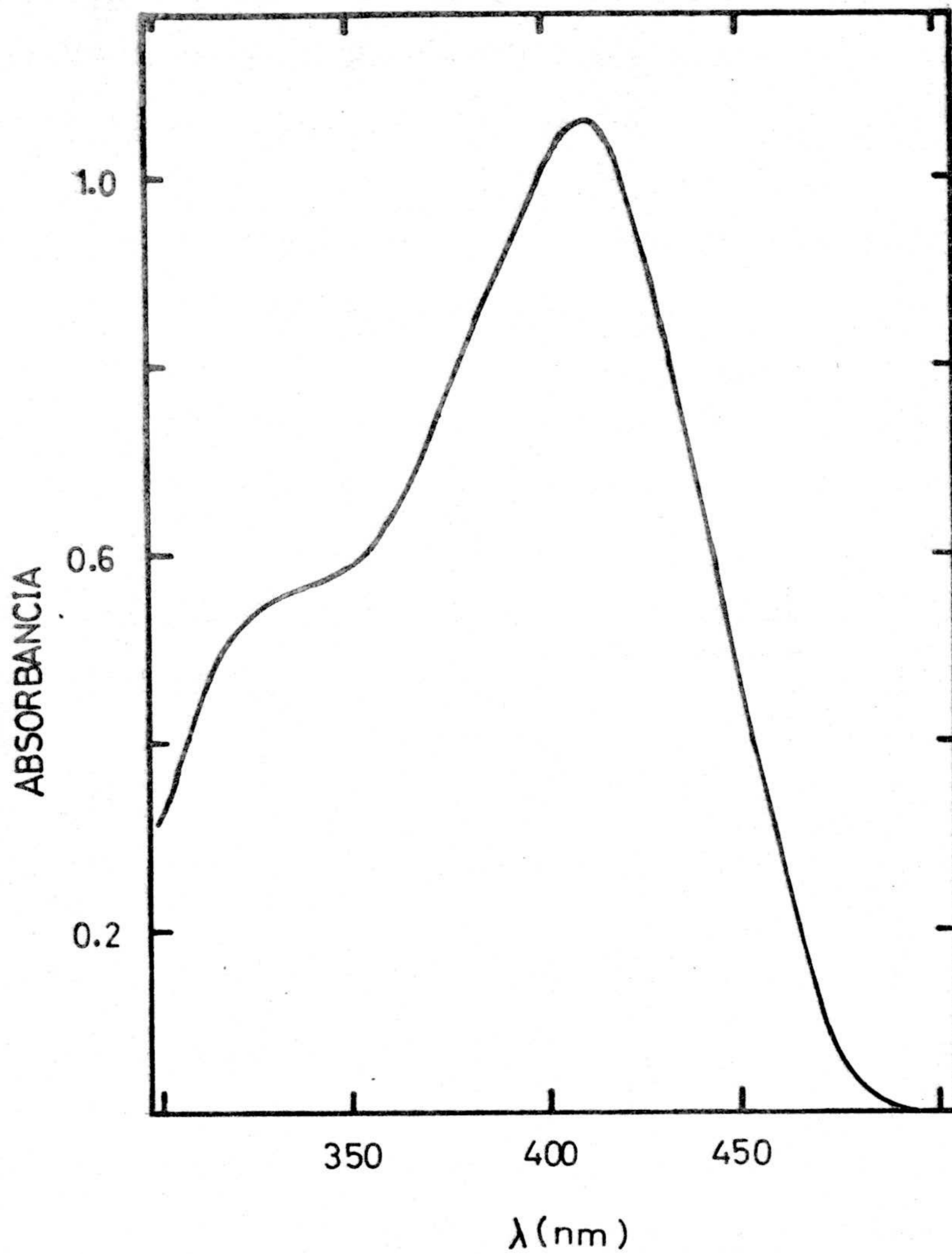


Fig. 15. Espectro de diferencias de mezclas PLP-albúmina en relación molar 2:1, al que se le ha restado la absorción del espectro a relación molar 1:1, obtenido de la fig. 14.

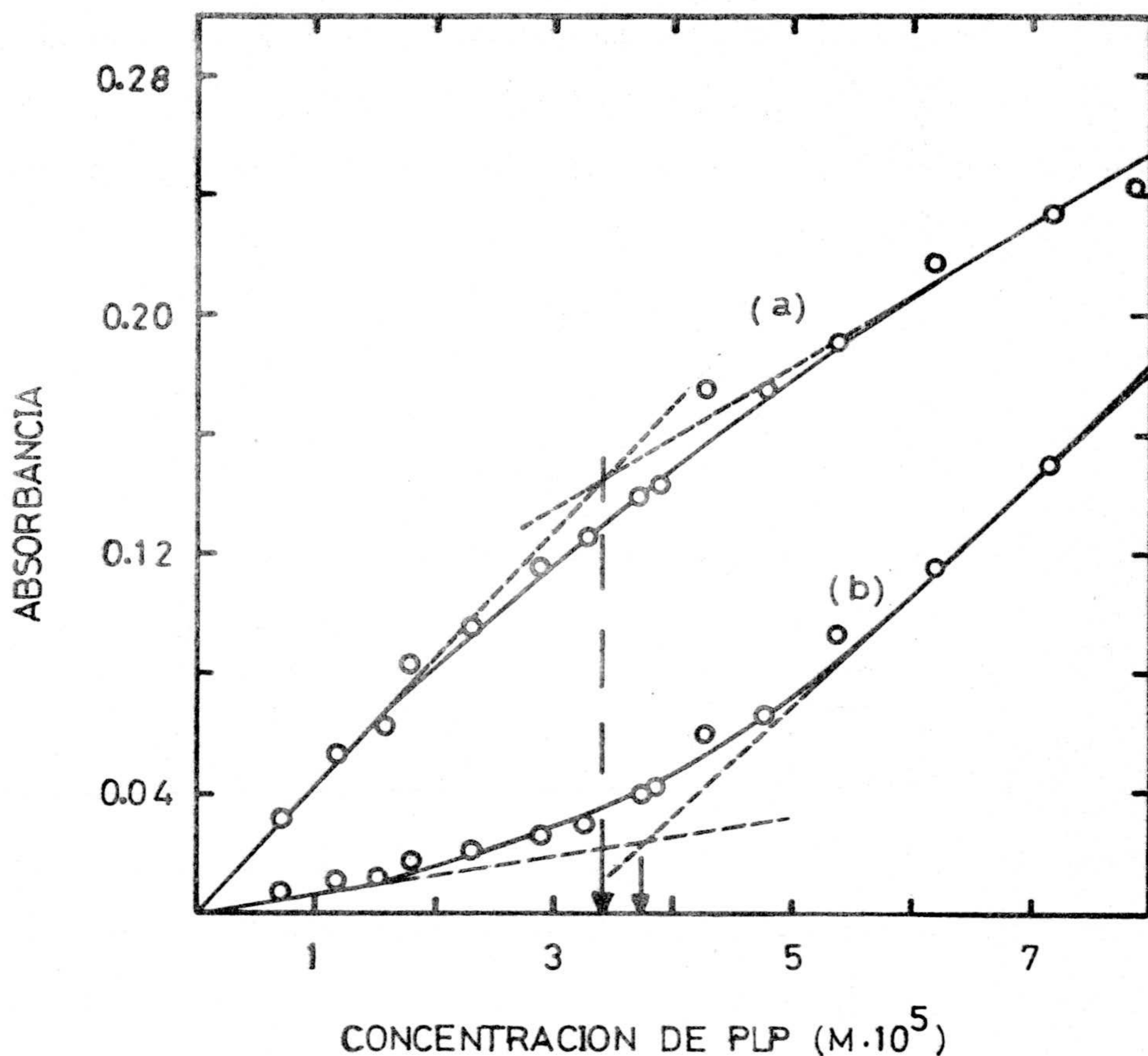


Fig. 16. Estequiometría del complejo PLP-albúmina. absorbancia vs. concentración final de fosfato de piridoxal. albúmina, $3,7 \cdot 10^{-5}$ M. en tampón de fosfatos 0,1 M. pH 7
 (a) absorbancia a 335 nm.
 (b) " " 415 nm.
 paso de luz de la cubeta utilizada: 10mm

de observar un cambio en el aumento de absorbancia a 335 nm a esa misma relación, la cual se podría interpretar como consecuencia de que el complejo adscrito al sitio I se ha formado por una reacción mol a mol de albúmina y PLP.

El hecho de que a partir de esta relación PLP/albúmina = 1 sigue aumentando la absorción a 335 nm considerablemente debe ser interpretado como consecuencia de la absorbancia a 335 nm que presenta el compuesto formado a relaciones molares PLP/albúmina superiores a 1 (figura 15). Esta absorbancia es lo suficientemente grande como para impedir un cambio brusco de la misma a 335 nm a lo largo de la valoración. No obstante, para tratar de eliminar esta absorbancia a 335 nm del compuesto adscrito al sitio II, y teniendo en cuenta que la constante de disociación de este complejo es mayor que la del sitio I, se realizó la valoración usando concentraciones de albúmina del orden de 10^{-6} M, utilizando células de 10 cm de paso de luz para poder medir absorbancias en este rango de concentración. Una de estas valoraciones está representada en la figura 17.

Como se puede observar, el resultado de la valoración a 335 nm, usando concentraciones de albúmina del orden de 10^{-6} M, no es mucho más satisfactorio que el representado en la figura 16 con concentraciones superiores. Por esta razón, se realizó la valoración usando medidas de fluorescencia.

b) Fluorescencia. Los aminoácidos responsables de la fluorescencia en proteínas son la fenilalanina, tirosina y triptófano. Las emisiones en disolución acuosa están constituidas -

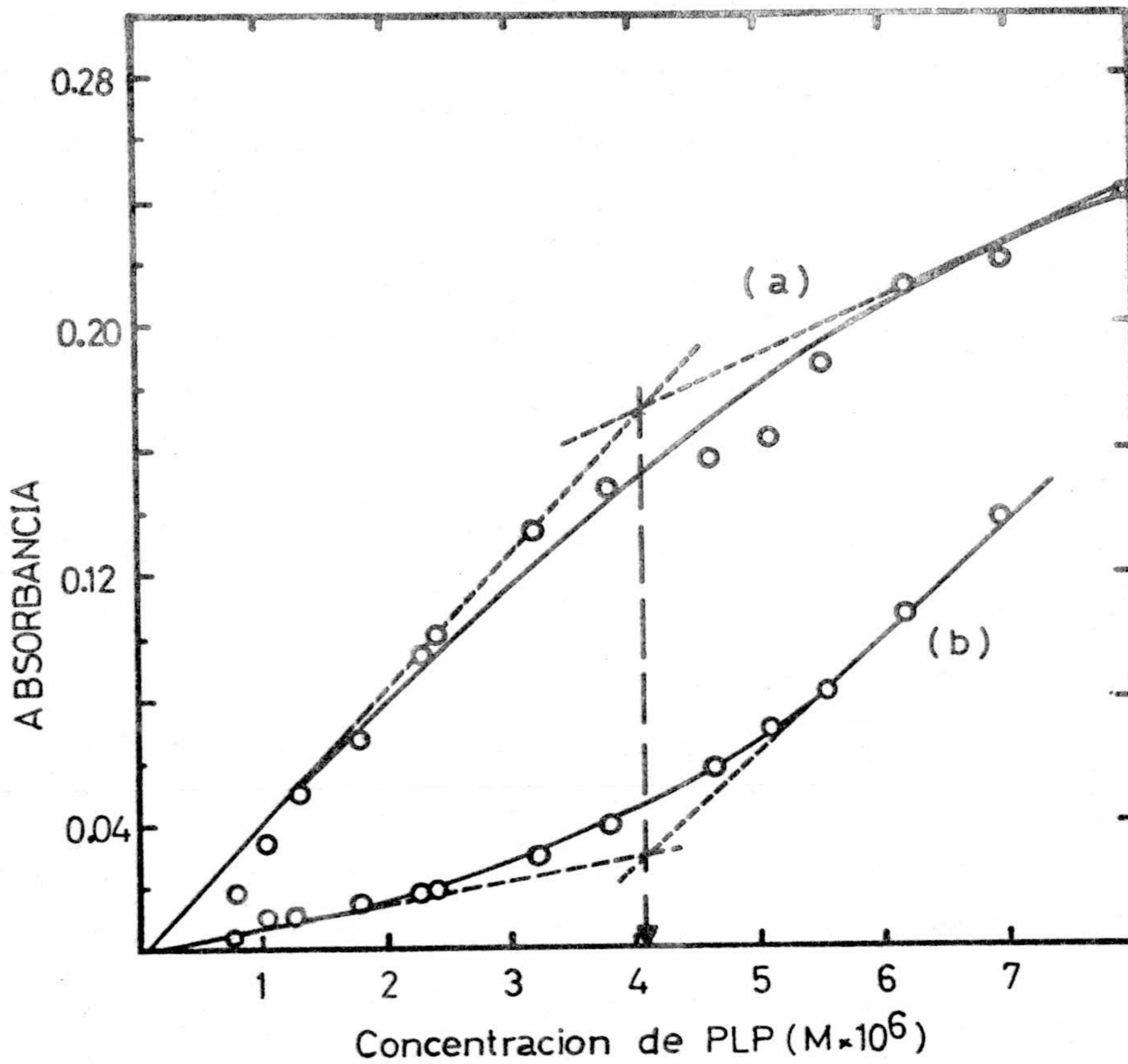


Fig. 17. Estequiometría del complejo PLP-albúmina. absorbancia vs. concentración final de fosfato de piridoxal. albúmina, $3,85 \cdot 10^{-6}$ M. en tampón de fosfatos 0,1 M. pH 7
 (a) absorbancia a 335 nm
 (b) " " 415 nm
 paso de luz de la cubeta utilizada: 100mm

por bandas simples con máximos a 282 nm. para la fenilalanina, 303 nm. para tirosina, y 348 nm. para triptófano. Los rendimientos cuánticos para los aminoácidos libres son respectivamente 4%, 21% y 20%. Desde luego que estas características de fluorescencia de los aminoácidos en disolución acuosa no tienen por qué ser iguales a aquellas que tengan en una proteína. Como se puede observar en la figura 18, la valoración de albúmina con PLP a una concentración $6,2 \cdot 10^{-6}$ M. en proteína, y pH neutro, fue llevada a cabo en primer lugar excitando las muestras a 280 nm., donde se encuentra el máximo del espectro de excitación de la albúmina, y midiendo la emisión de fluorescencia a 350 nm., correspondiente al máximo de emisión de la proteína.

Al igual que ocurría en la valoración espectrofotométrica, cuando la relación molar PLP/albúmina = 1 aproximadamente, se produce un cambio en la variación de la intensidad de la emisión, como consecuencia de la formación del complejo PLP/albúmina de acuerdo con una estequiometría equimolecular.

Igualmente, la valoración fue seguida midiendo la intensidad del espectro de emisión a 400 nm., excitando las muestras a 330 nm. (fig.19). Esta fluorescencia puede asignarse al PLP unido a la enzima, aunque no puede excluirse "a priori" contribuciones de PLP libre, debido a que éste absorbe en dicha región.

También en este caso se produce un cambio brusco en la variación de intensidad en el espectro de emisión cuando la relación molar PLP/albúmina = 1 aproximadamente, coincidiendo ,

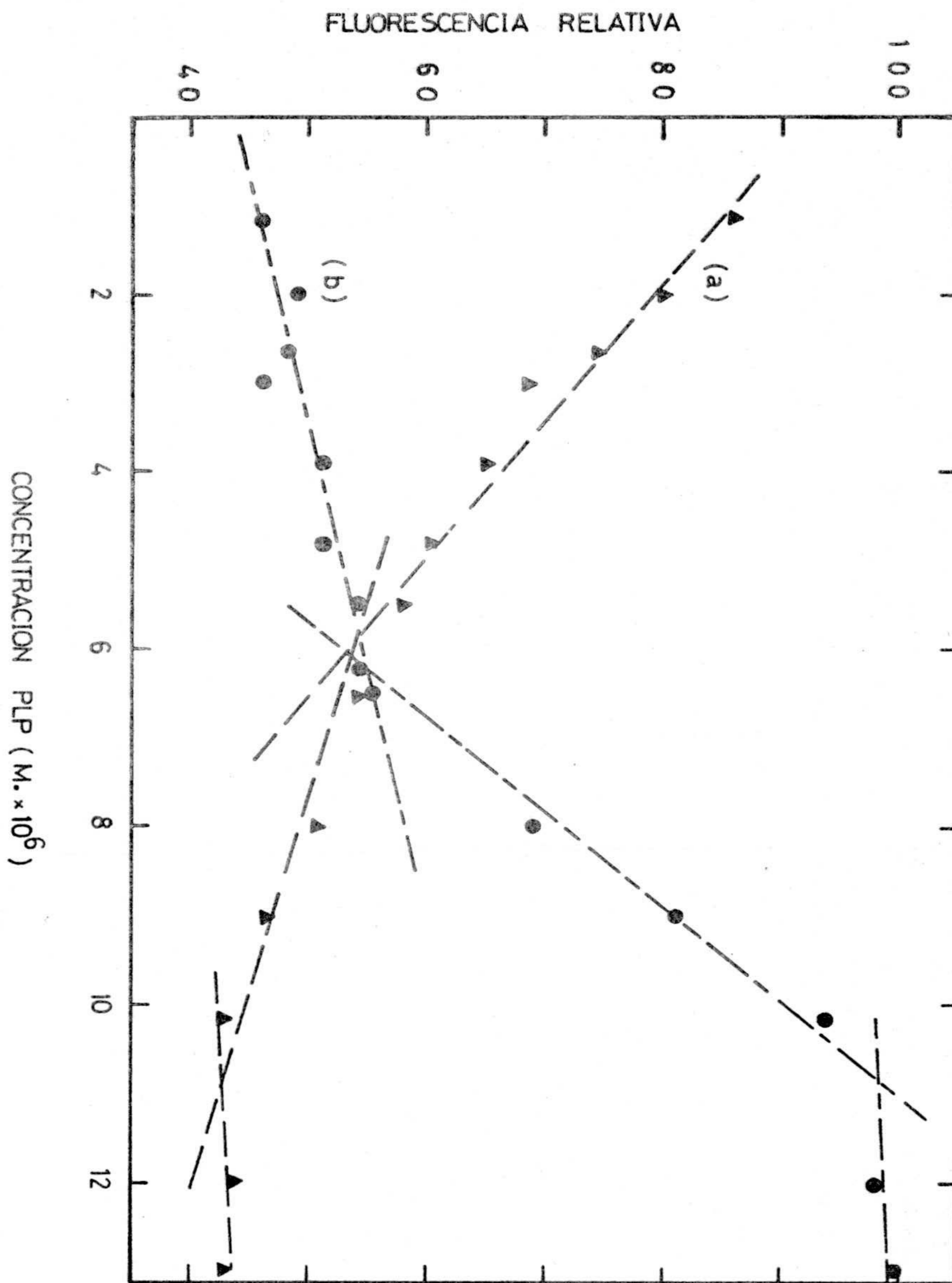


Fig. 18. Estequiometría del complejo PLP-albúmina. Intensidad de fluorescencia vs. concentración final de PLP. albúmina, $6,2 \cdot 10^{-6}$ M. en tampón de fosfatos 0,1 M. pH 7.

(a) $E_x = 280$ nm.; $E_m = 350$ nm.

(b) $E_x = 330$ nm.; $E_m = 400$ nm.

paso de luz de la cubeta: 10 mm.

los complejos PLP-albúmina se formaban a concentraciones de albúmina $6 \cdot 10^{-4}$ M., siendo diluidos posteriormente a la concentración del experimento.

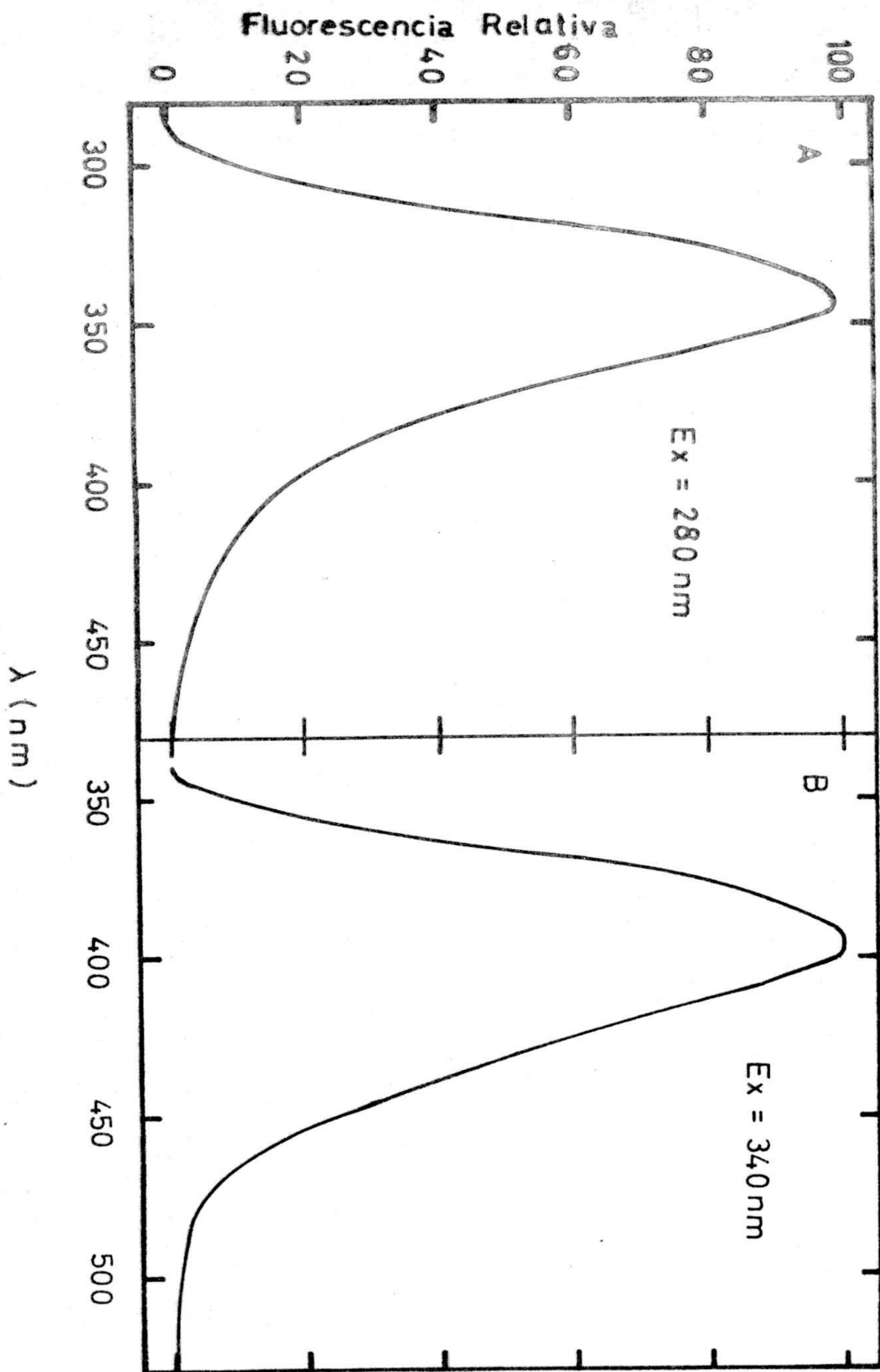


Fig. 19. Espectros de fluorescencia del complejo PLP-albúmina (I).

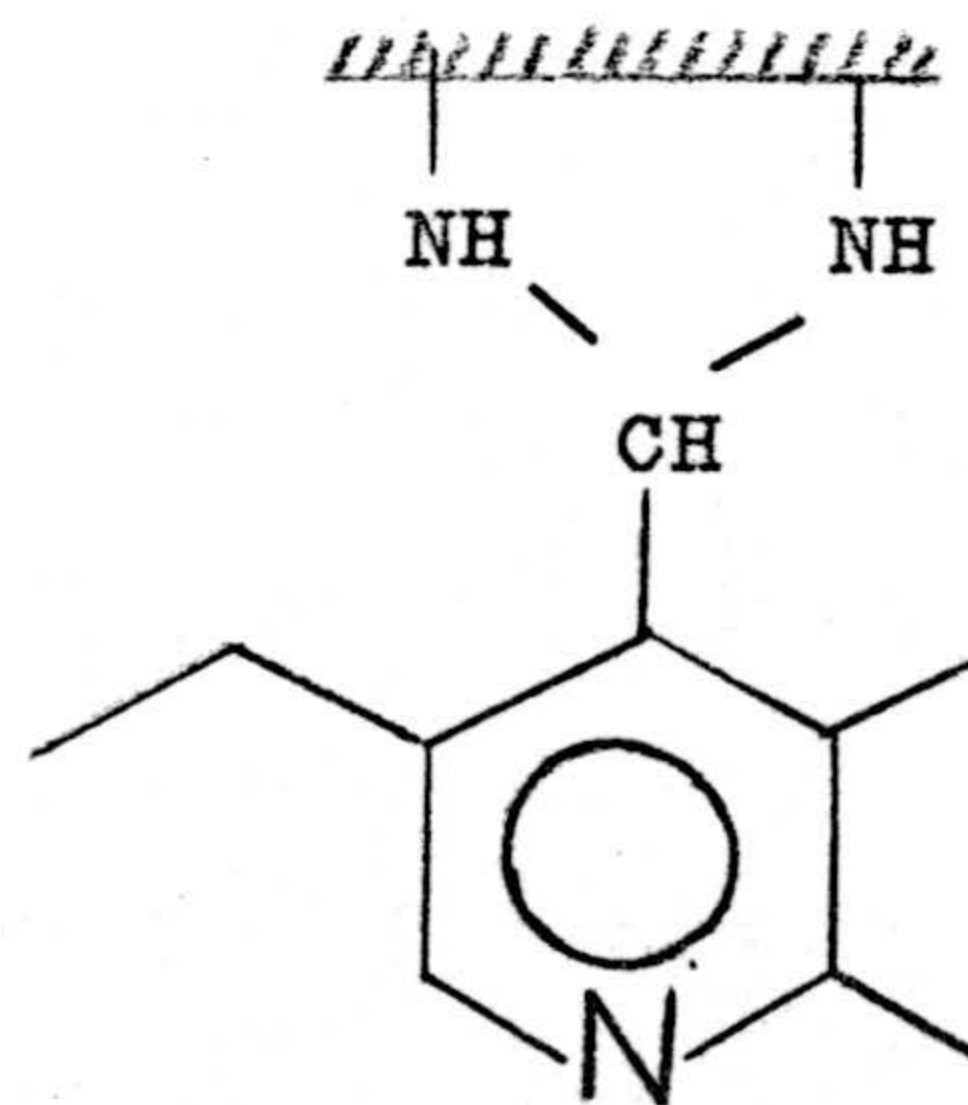
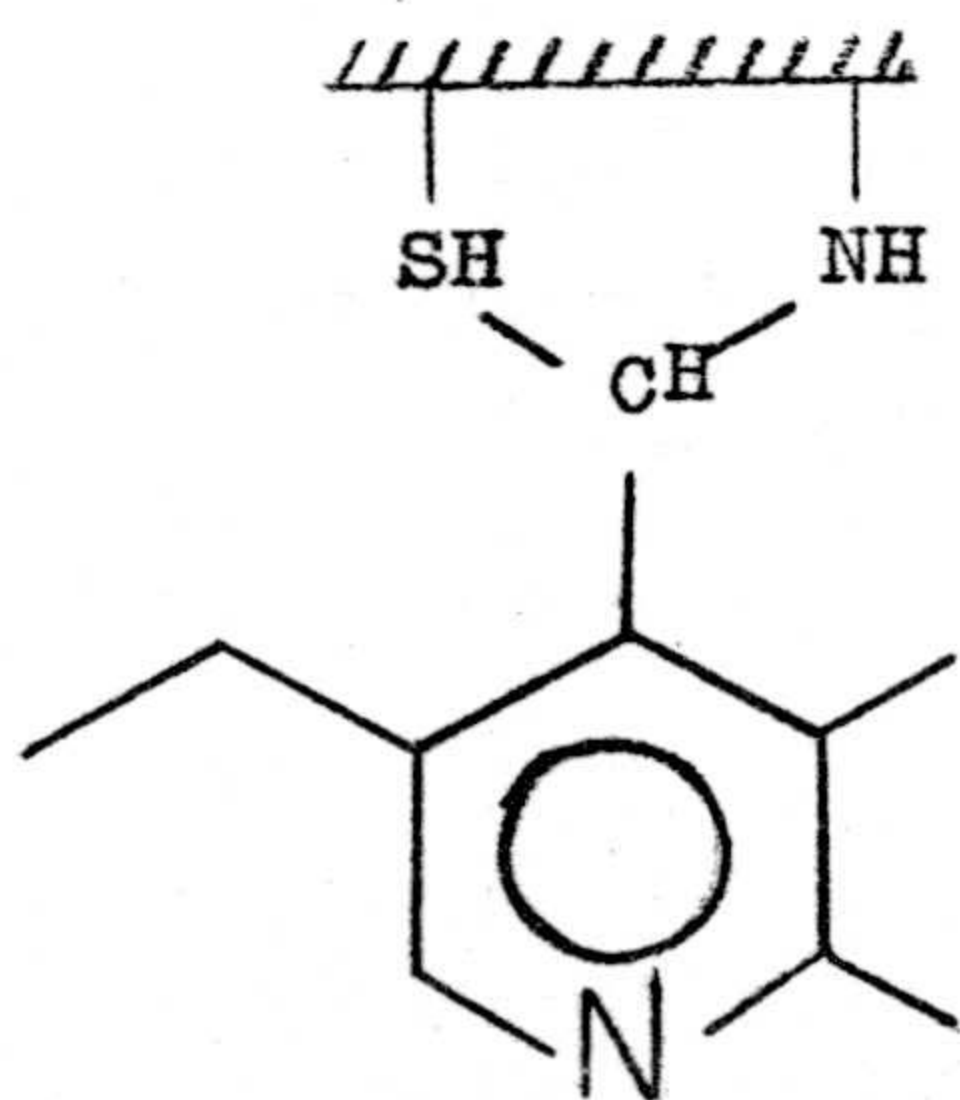
(A) fluorescencia de la proteína. (B) fluorescencia del PLP. Ambas curvas han sido normalizadas en sus máximos.

la estequiometría de formación del complejo con la de los resultados anteriores.

Cuando la relación molar PLP/albúmina se hace superior a 2, la intensidad del espectro de emisión permanece constante, lo que puede ser interpretado como consecuencia de la formación del complejo II de acuerdo con una relación estequiométrica PLP:albúmina, 2:1.

De las representaciones dadas en las figuras 16 y 17, se observa que la constante de equilibrio de formación del complejo 1:1 (sitio I) es mucho mayor que la del complejo 2:1, (sitio II). Sin embargo, en la actualidad no estamos interesados en los valores cuantitativos, bastando aquí con esta disquisición cualitativa.

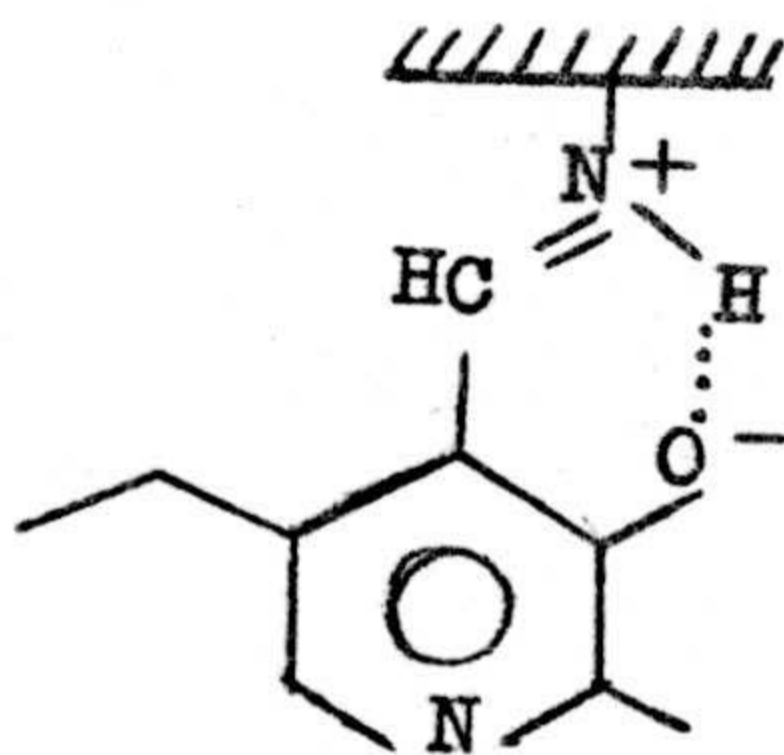
Podemos afirmar, según los resultados obtenidos, que a relaciones molares PLP/albúmina = 1, se forma un complejo a pH neutro para el que Christensen (80), basándose en la banda de absorción a 335 nm. y en el hecho de que no resultaba posible su reducción con NaBH_4 , supuso que la unión debería de ser según uno de los dos siguientes tipos:



aunque dichas estructuras deben tomarse hoy en día como especulaciones, puesto que no está demostrada su existencia y existen muchas más posibilidades.

Las características espectrales de este complejo son similares a aquellas del sitio del PLP en fosforilasa, el cual presenta también dos bandas a 335 nm. y 415 nm, si bien la relación de absorbancias a ambas longitudes de onda, 335:415, es algo superior en fosforilasa (fig. 20). Igualmente, tampoco es posible la reducción de la enzima a pH 7 con NaBH_4 ; en ambos hechos basamos su utilización como modelo del sitio del PLP en fosforilasa.

Para una relación molar PLP/albúmina = 2, aparece un segundo complejo para el que Christensen supuso, basándose en la absorbancia a 415 nm. y en la posibilidad de reducción del mismo con NaBH_4 , que la unión podría estar constituida por una base de Schiff:



Una vez caracterizados estos complejos, se escogieron las condiciones experimentales que nos permitían tener en disolución una especie química y no otra. Así, a continuación se describen los resultados de la reducción polarográfica de ambos complejos adscritos a los sitios I y II.

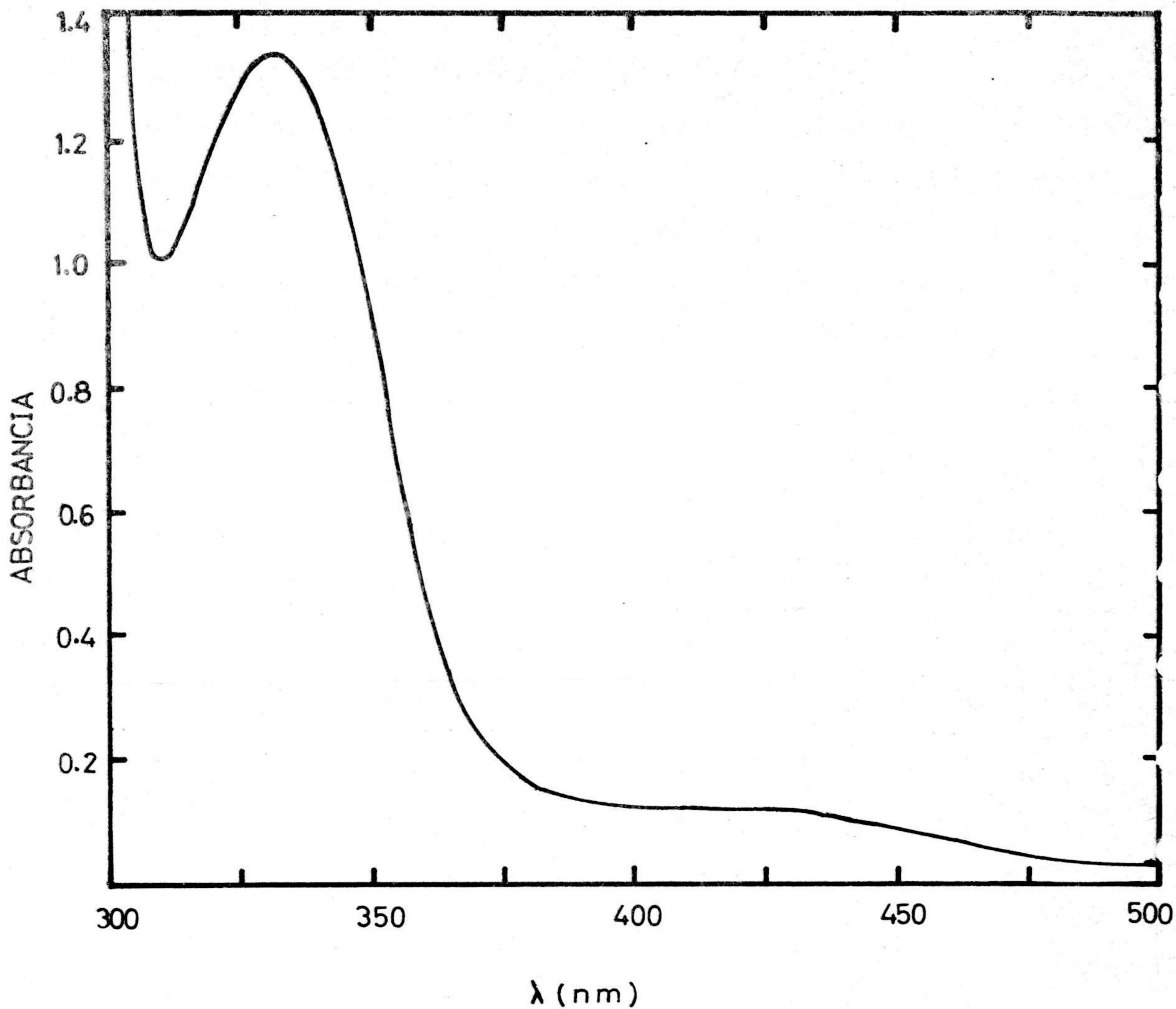


Fig. 20. Espectro de PLP en fosforilasa $2,2 \cdot 10^{-4}$ M.

c. Polarografía del complejo PLP-albúmina (sitio I). A

continuación se dan los resultados obtenidos al hacer la polarografía del complejo albúmina-PLP, 1:1, es decir, el sitio 1. En la tabla I se indica la variación de la intensidad de la onda de reducción con el pH, indicando, además, el potencial de semionda y el coeficiente $n\alpha$. Algunos de estos polarogramas, se repitieron para asegurarnos de los valores dados.

TABLA I

Influencia del pH sobre la reducción del complejo PLP-albúmina (sitio I).

pH	i(μ A)	-E 1/2(v.)	$n\alpha$
2,6	0,48	0,52	1,0
3,7	0,46	0,60	1,0
4,3	0,36	0,64	1,0
5,1	0,47	0,69	0,8
7,5	0,15	1,02	0,4
8,0	0,25	1,03	0,3

El complejo se formó mezclando cantidades equimoleculares de ambas sustancias ($c=1,6$ mM.), a pH 7, durante 24 horas. Alícuotas de esta disolución se añadían al tampón requerido para obtener los pH adecuados ($c=10^{-4}$ M.).

Los valores de potencial de onda media, intensidad y de $n\alpha$ encontrados para estas ondas, a pH inferior a la neutralidad, indican que las mismas podrían corresponder a PLP libre en la disolución si comparamos dichos valores con los encontrados para esta especie en disolución acuosa (35).

El hecho de que la intensidad de la onda disminuya al aumentar el pH se puede explicar si se tiene en cuenta que la disociación del complejo PLP-albúmina se produce a valores de pH inferiores a cinco, estando sin disociar a valores de pH próximos a la neutralidad(80). A estos valores de pH, neutro, aparece una onda a potencial mucho más negativo que los encontrados a valores de pH inferiores, y con un coeficiente α mucho más bajo, o sea, que la onda aparece mucho más tum-bada. A estos valores de pH, la onda de PLP libre o sus ba-ses de Schiff en agua es muy diferente y aparece a potencia-les más bajos(35). Por esta razón, podría pensarse que esta onda es la debida a la reducción del PLP en el sitio I, por lo que se procedió a su estudio en función de la concentra-ción, altura de la columna de mercurio, y tipo de disolución fondo. En las figuras 21 y 22 se dan algunos de los polaro-gramas obtenidos, a título de ejemplo.

En la tabla II se da la variación de esta onda con la concentración de complejo PLP-albúmina. En dicha tabla se ob-serva que la intensidad de la onda no es proporcional a la concentración de sustancia electroactiva y que su potencial de semionda varía ligeramente con la concentración. Estos he-chos unidos a los bajos valores de α parecen indicarnos que la onda es de tipo catalítico. Posterior confirmación se ob-tiene de los resultados dados en las tablas III y IV en las que se observa una variación del potencial de semionda con la altura de la columna de mercurio y el fondo utilizado. La influencia de ambos factores sobre la intensidad es la que ca

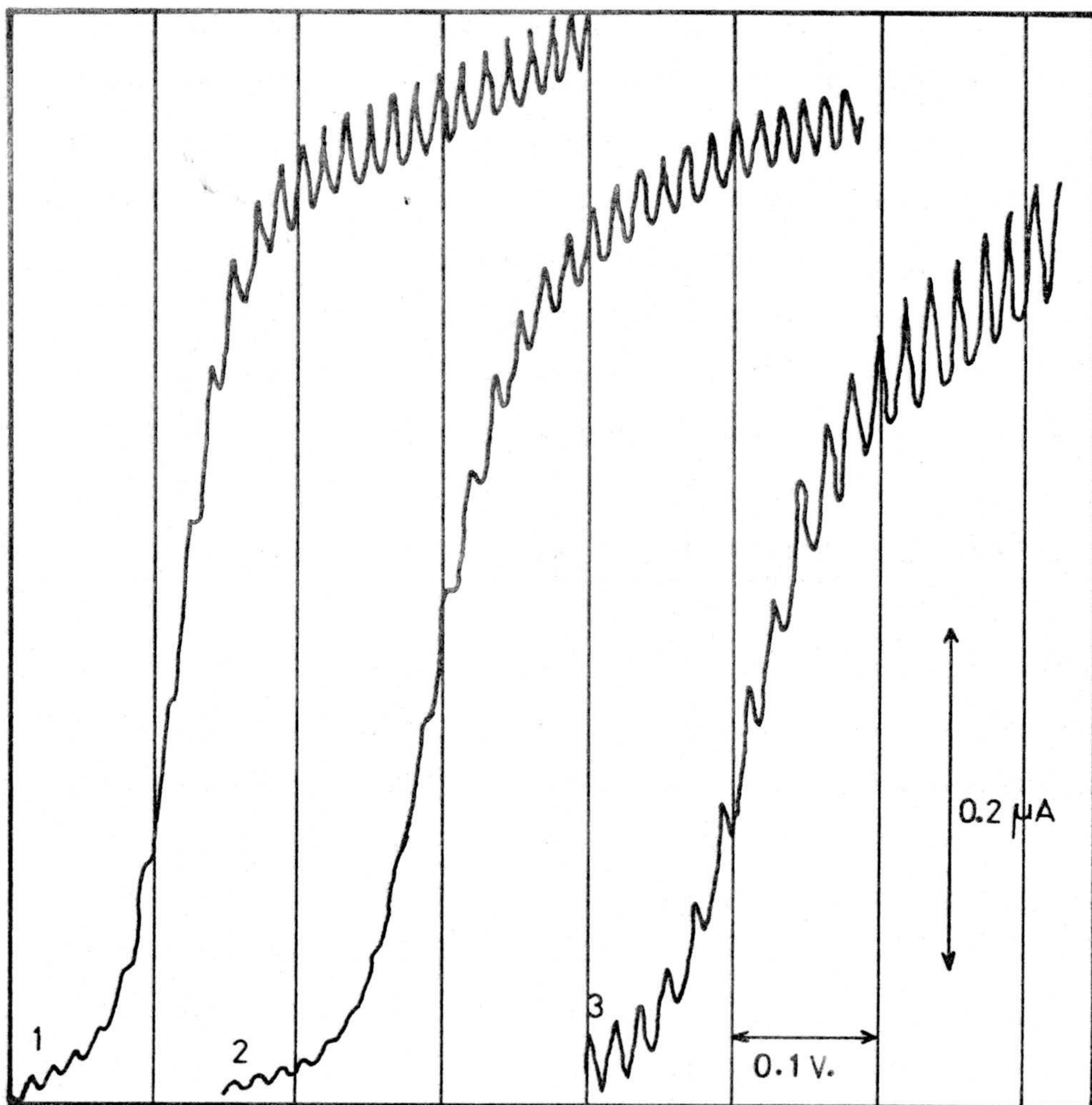


Fig. 21. Polarograma del complejo PLP-albúmina (sitio I) en función del pH, frente al E.C.S. Potencial de registro original: 1) -0,4 2) -0,45 3) -0,525. Valores de pH: 1) 2,6 2) 3,7 3) 4,3

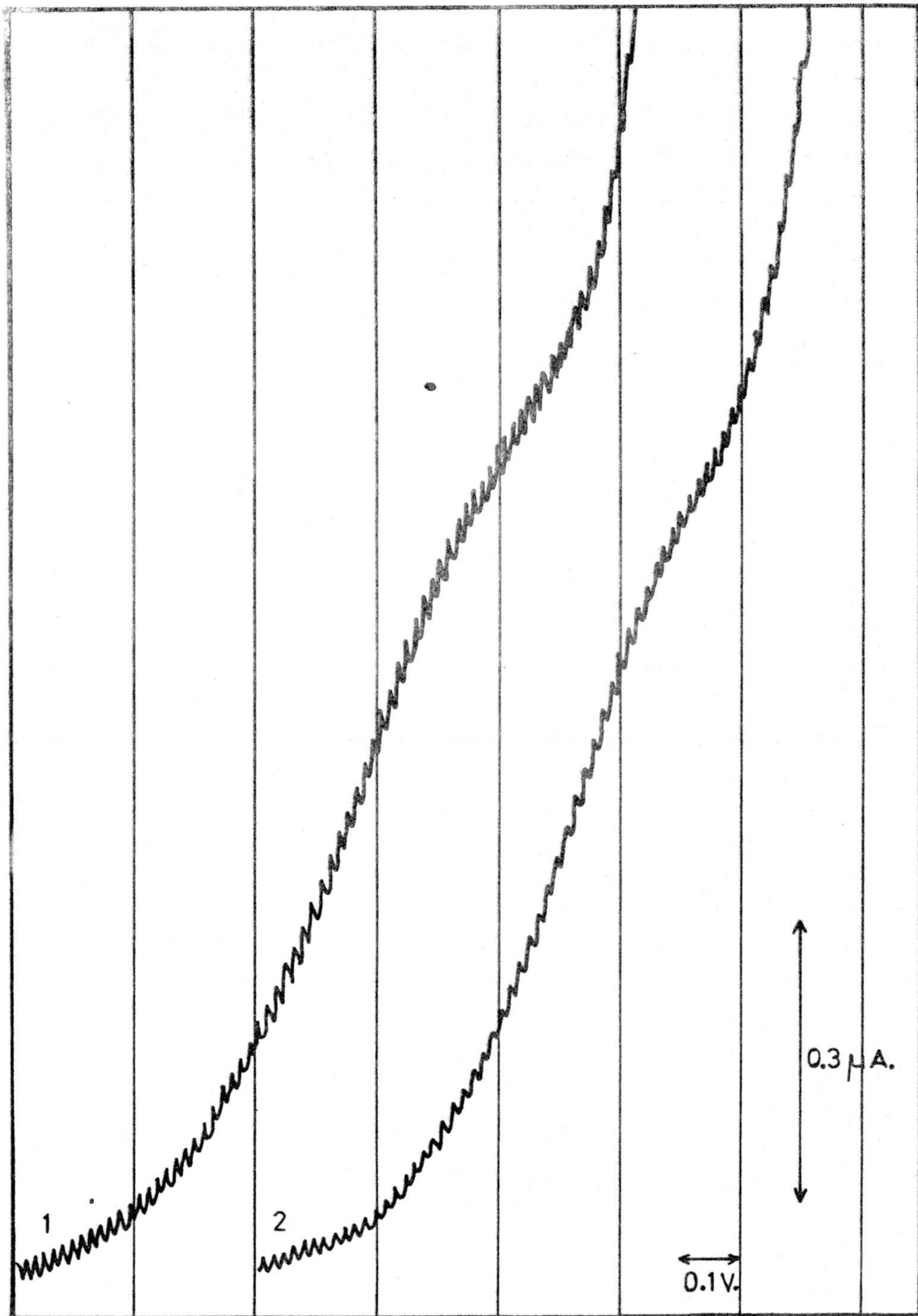


Fig. 22. Polarogramas del complejo PLP-albúmina, sitio I. Potencial de registro original: 1)-0,5 2)-0,6. Electrolito fondo: 1) disolución de fosfatos 0,1 M. pH 7. 2) bromuro de tetrametil amonio a pH 7,05 con hidróxido de tetrametil amonio.

be esperar para una corriente catalítica(95).

TABLA II

Influencia de la concentración sobre la polarografía del complejo PLP-albúmina (sitio I).

$c \cdot 10^4$ (M.)	i (μ A)	-E 1/2 (v.)	$n\alpha$
1,0	0,15	1,02	0,4*
1,6	0,74	1,07	0,3
3,4	0,64	1,10	0,3
8,2	0,57	1,10	0,5

El complejo se preparó como se describe en la tabla I ($c = 1,6$ mM.) y se diluyó a un tampón de fosfato de pH 7,0 ($c = 0,1$ M.)

*concentración del tampón : 0,05 M.

TABLA III

Influencia de la altura de mercurio sobre la polarografía de los complejos PLP-albúmina (sitio I)

	h (cm.)	i (μ A)	-E 1/2 (v.)
A)	12,5	0,57	1,0
	24,5	0,48	1,02
	34,5	0,74	1,07
	49,5	0,70	1,06
B)	12,5	0,52	1,07
	24,5	0,62	1,14
	34,5	0,57	1,10
	49,5	0,80	1,17

El complejo se formó como se ha indicado en la tabla I ($c=1,6$ mM.) y se diluyó a un tampón de fosfatos 0,1 M., pH 7.

A) conc. de complejo: $1,6 \cdot 10^{-4}$ M.

B) conc. de complejo: $8,2 \cdot 10^{-4}$ M.

TABLA IV

Influencia de la disolución fondo utilizada sobre la polarografía del complejo PLP-albúmina (sitio I).

disolución fondo	i(μA)	-E _{1/2} (v)	nα	conc. complejo M. 10 ⁴
fosfatos 0,05M. pH7,5	0,15	1,02	0,4	1,0
fosfatos 0,1 M. pH7,0	0,74	1,07	0,3	1,6
bromuro de (CH ₃) ₄ N ⁺ pH 7,0 con (CH ₃) ₄ NOH	0,57	1,14	0,4	7,7
PIPES + (OH)Li 0,05M. pH 8,4	0,59	1,05	0,3	4,1

el complejo se formaba como se ha indicado en las tablas anteriores, diluyendo posteriormente con los tampones deseados hasta las concentraciones que se indican en la tabla.

En la bibliografía existe evidencia de que, a veces, los protones o iones del medio se reducen más fácilmente adsorbidos que en disolución(95), dando origen a ondas catalíticas. Aquí existe la posibilidad de que la proteína catalice dicha reducción. Por esta razón, se ha procedido al estudio de albúmina sola.

d. Polarografía de albúmina. En la tabla V se resumen los resultados obtenidos al hacer polarografía de albúmina a pH neutro

TABLA V

Polarografía de albúmina a pH neutro

h (cm)	i (μ A)	-E 1/2(v)	n α
12,5	0,48	1,11	0,4
24,5	0,72	1,12	0,4
34,5	0,55	1,075	0,4
34,5	0,56	1,05	0,3

el tampón utilizado fue fosfato 0,1 M.
la concentración fue $6,3 \cdot 10^{-4}$ M., excepto para la última que fue $4,1 \cdot 10^{-4}$ M.

De la observación de esta tabla se podía pensar que esta onda respondía a las mismas características que la obtenida para el complejo PLP - albúmina. El hecho de que esta onda fuera la correspondiente anódica a una oxidación de los puentes disulfuro de la albúmina, se investigó realizando polarografía de cistina. Como se puede apreciar en la figura 23, la polarografía de esta sustancia da lugar a dos ondas con potenciales -0,45 volts. y -0,78 volts., que no coinciden con la onda que se obtiene para la albúmina.

La posibilidad de que se tratara de una onda catalítica debida a la adsorción, sobre la proteína, de iones alcalinos procedentes de los tampones utilizados, y cuya descarga se

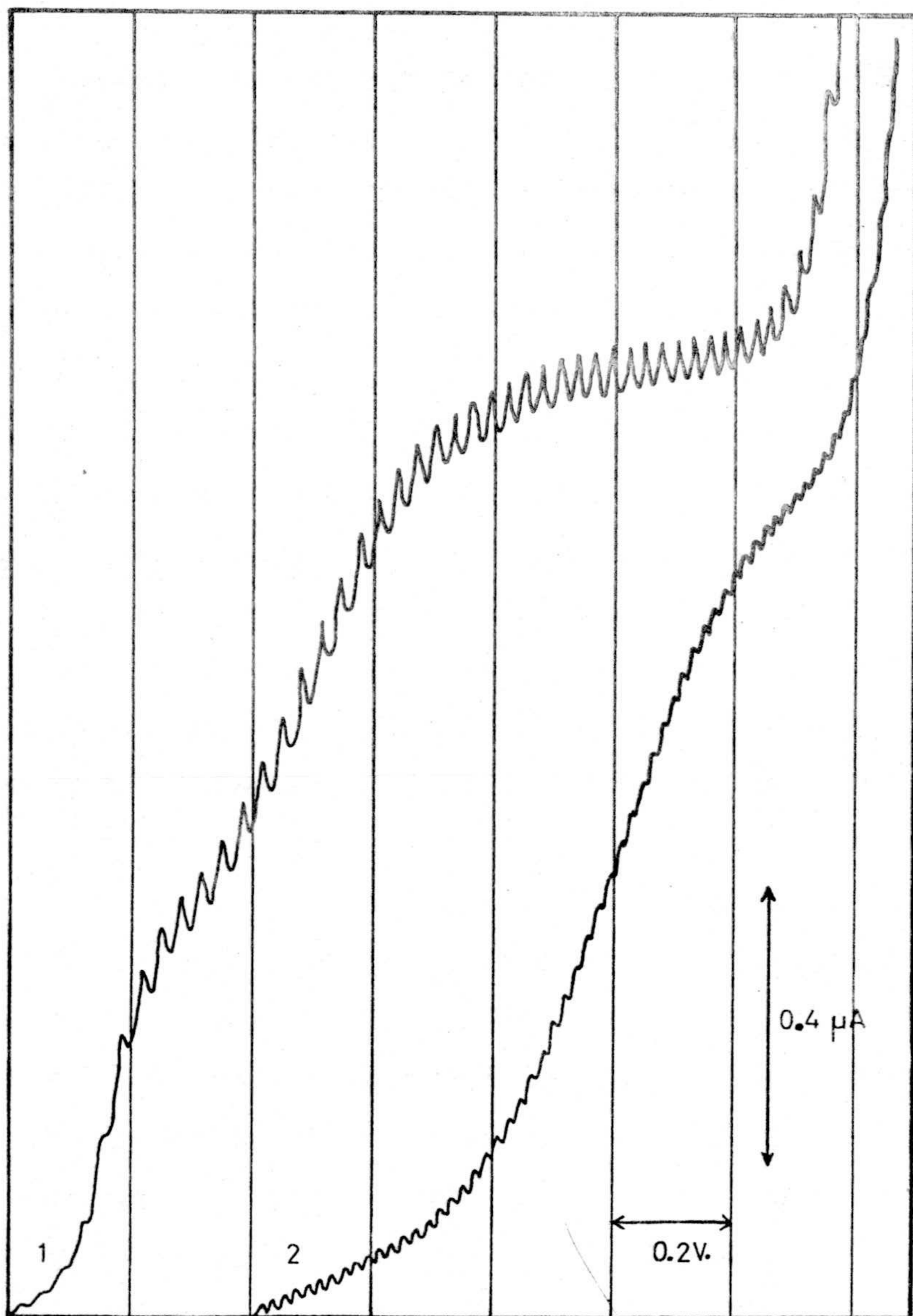


Fig. 23. 1) Polarograma de cistina. Potencial original de registro: $-0,3$ 2) Polarograma de albúmina. Potencial original de registro: $-0,5$.

viera catalizada por la albúmina, también fue investigada. Para esto se preparó un tampón constituido por PIPES 0,1 M., en su forma ácida, recristalizado al menos tres veces, y llevado a pH neutro con hidróxido de tetrametil amonio.

Antes de hacer polarografía de la albúmina en este tam - pon, se hizo una diálisis exhaustiva de una disolución de 2 ml. de proteína frente a medio litro de tampón, cambiándose cuatro veces el tampón de diálisis. Como se puede observar - en la figura 24, el resultado fue la aparición de la onda - que ya se obtenía en anteriores condiciones.

La obtención de ondas a potenciales más negativos que -1,5 volts. se hacía imposible dado que aun cuando el fondo PIPES más hidróxido de litio a pH 8,5 aparecía a -1,8 volts., cuando en este fondo se ponía proteína, el mismo era llevado a potenciales del orden de -1,5 volts.

Estos últimos resultados, nos confirman la posibilidad - apuntada anteriormente de que la onda obtenida corresponde a una reducción de los protones adsorbidos sobre la proteína y catalizada por la misma, y parecen demostrar que el PLP en el sitio I del complejo con albúmina no puede reducirse pola - rograficamente. Por esta razón se pasó a estudiar el sitio II.

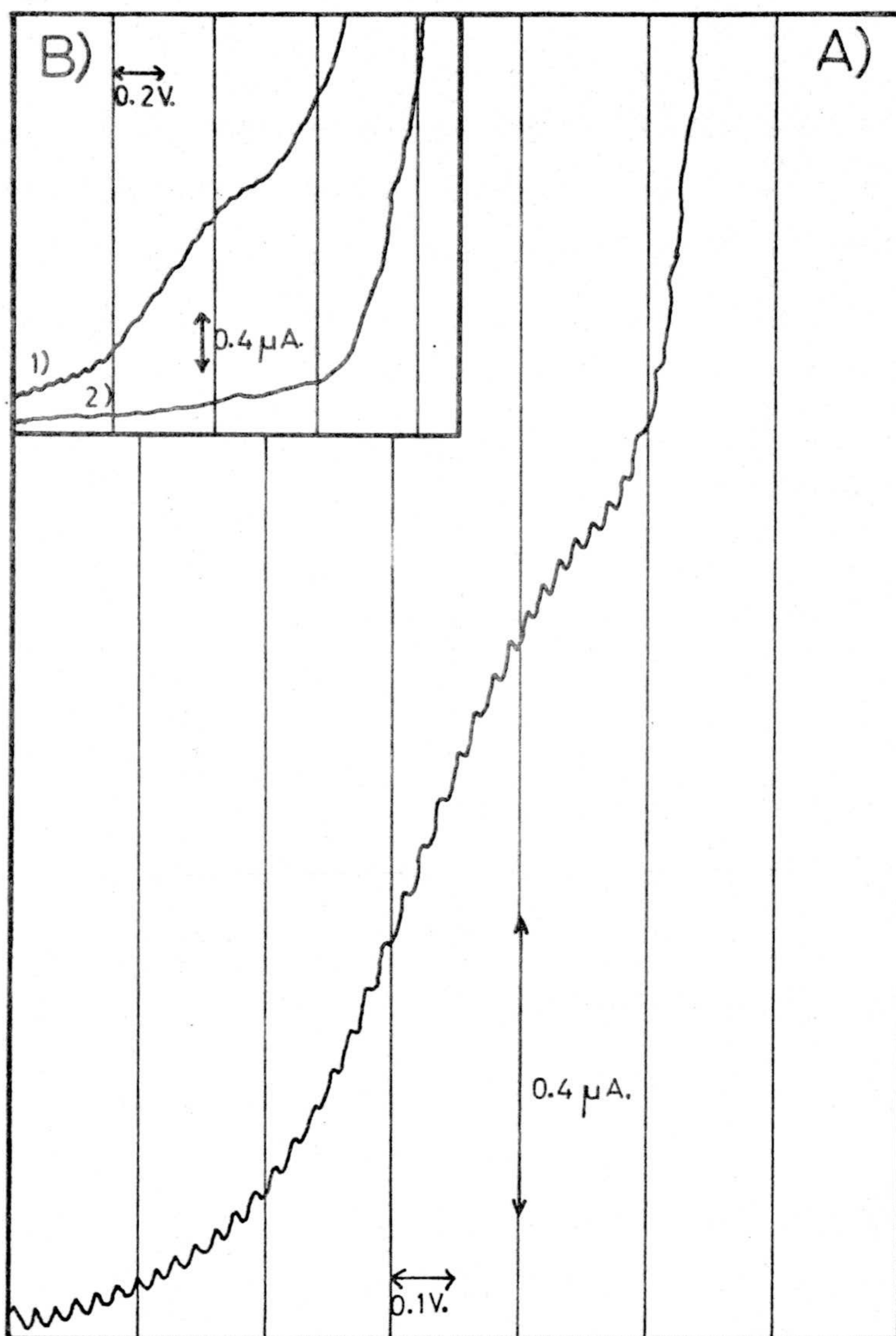


Fig. 24. A) Polarograma de albúmina, $5,5 \cdot 10^{-4}$ M. en tampón PIPES más hidróxido de tetrametil amonio. Potencial original de registro: -0,5.

B) Polarogramas de albúmina y disolución fondo pH 8,5

1) albúmina, $5 \cdot 10^{-5}$ M. potencial original de registro: 0,5

2) PIPES - hidróxido de litio 0,05 M. potencial original de registro: -0,5

e. Polarografía del complejo PLP-albúmina (sitio II).

En la tabla VI se han resumido los resultados obtenidos a diferentes valores de pH.

TABLA VI

Influencia del pH sobre la polarografía del complejo PLP-albúmina (sitio II).

pH	i(μ A)	-E _v /2(v)	n α
3,75	0,82	0,62	1,0
5,0	0,67	0,69	1,0
6,0	0,50	0,74	1,0
6,3	0,17	0,76	1,0
* $\left. \begin{matrix} i_1 \\ i_2 \end{matrix} \right\} 7,0$	0,11	0,84	1,0
	0,16	1,11	0,5

el complejo se formó como se describe en la tabla I, pero poniendo doble cantidad de PLP, con lo que tenemos llenos los sitios I y II ($c = 10^{-4}M$).

* a este pH aparecen dos ondas que hemos llamado i_1 e i_2 .

Comparando estos valores con los obtenidos para el sitio I, (tabla I), se observa que como allí, hasta un pH cercano a seis, las ondas obtenidas pueden achacarse a la reducción del PLP libre, que aquí tiene una altura de onda aproximadamente el doble, pues doble es la cantidad de PLP. Sin embargo, a valores de pH entre 6 y 7, en los que ambos complejos son estables, se observa una pequeña onda a un potencial de semionda cercano a -0,8 volts. con una intensidad muy pequeña comparada con la obtenida a pH más bajos. Su potencial de

semionda y coeficiente $n\alpha$ podrían corresponder a los del PLP libre, indicándonos que la constante de equilibrio de formación del sitio II es mucho menor que la del sitio I, como ya se había visto por espectroscopía y fluorescencia. Sin embargo, dados los errores experimentales y la proximidad de los potenciales de semionda correspondientes al PLP en agua y, a sus bases de Schiff en medios de polaridad intermedia, no puede excluirse que esta onda sea la de reducción del complejo adscrito al sitio II. Como no conocemos la constante de velocidad de descomposición de este complejo, no hacemos estudios cuantitativos de la intensidad de la onda, ya que carecerían de fundamento.

A pH 7 se observa la onda catalítica de descarga de iones hidrógeno, análoga a la encontrada con albúmina sola o en el sitio I. En la figura 25 se dan algunos de los polarogramas obtenidos.

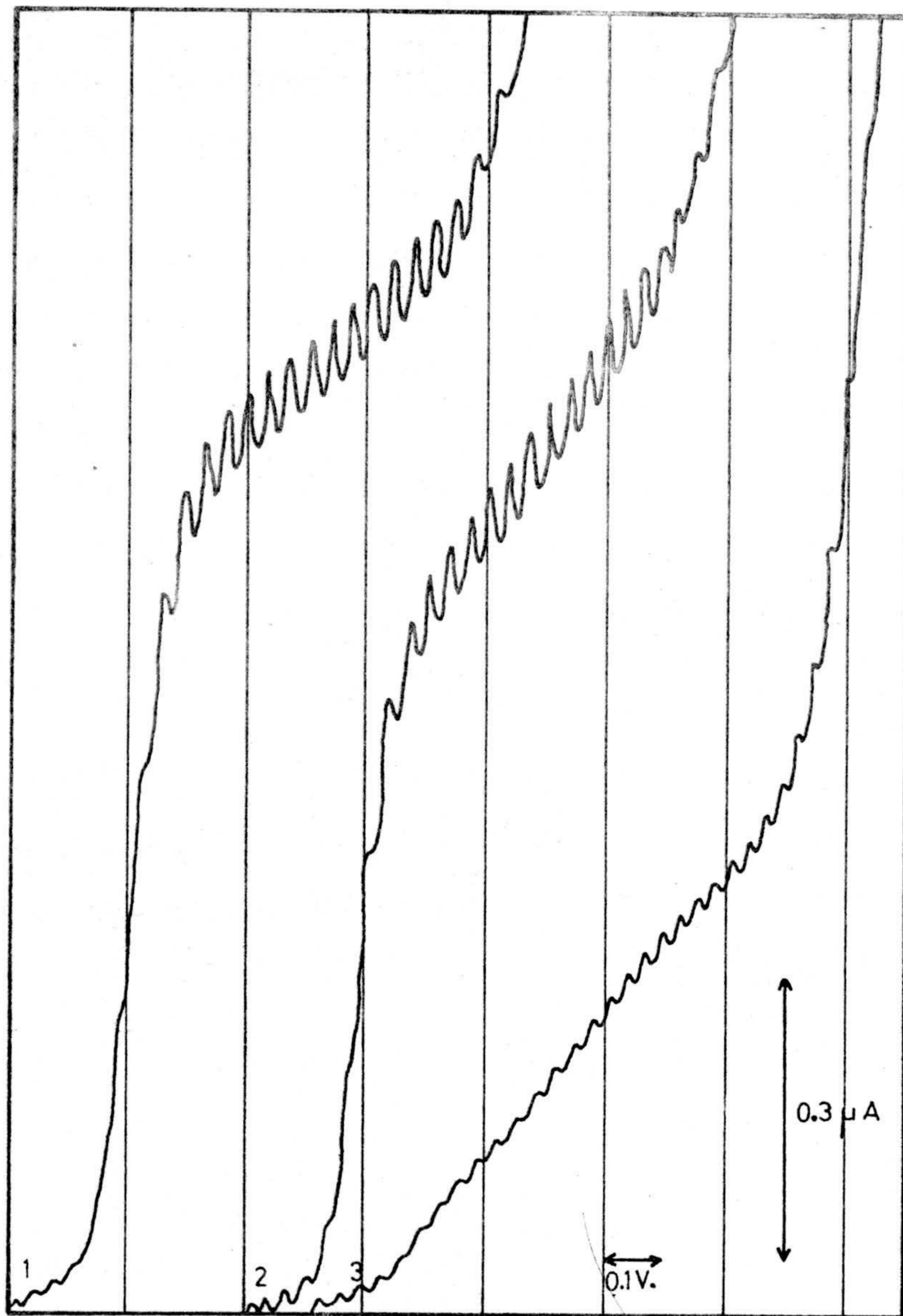


Fig. 25. Polarogramas del complejo PLP-albúmina (sitio II)

1)	Potencial original de registro:	-0,4	;	pH	3,75	
2)	"	"	"	-0,5	;"	5,0
3)	"	"	"	-0,7	;"	7,0

3. Polarografía de fosforilasa b. El polarograma de una muestra de fosforilasa a pH neutro se da en la figura 26, en la que se ve que el potencial de onda media y coeficiente $n\alpha$ son practicamente iguales a los valores obtenidos con albúmina sola o con el complejo PLP-albúmina (sitio I). A pesar de que en este caso la concentración de proteína es mucho menor que cuando se usaba albúmina, la intensidad de la onda es mucho mayor (tabla VII). Si siguiéramos suponiendo que esta onda se debe a la reducción de protones unidos a la proteína, esta discrepancia podría deberse al mayor tamaño de la molécula de fosforilasa respecto de la de albúmina.

TABLA VII

Polarografía de holo y apofosforilasa a pH neutro.

Enzima	$i(\mu A)$	$-E/2(v)$	$n\alpha$
holo	1,52	1,03	0,29
apo	1,51	1,07	0,30

fosforilasa, $1,33 \cdot 10^{-5}$ M. en glicerofosfato 0,05 M. pH 7,0 la apoenzima se preparó como se describe en EXPERIMENTAL, con concentración, $1,16 \cdot 10^{-5}$ M. en el mismo tampón que la holoenzima.

Una confirmación de que esta onda no se debía a la reducción del PLP se obtuvo al hacer la polarografía de la apoenzima (figura 26), que presenta una onda con las mismas características que la holoenzima (tabla VII).

Aparte de la actividad enzimática, un control de que el PLP estaba en la enzima (aunque no reducible polarograficamente) se tiene del espectro de absorción de ambas muestras

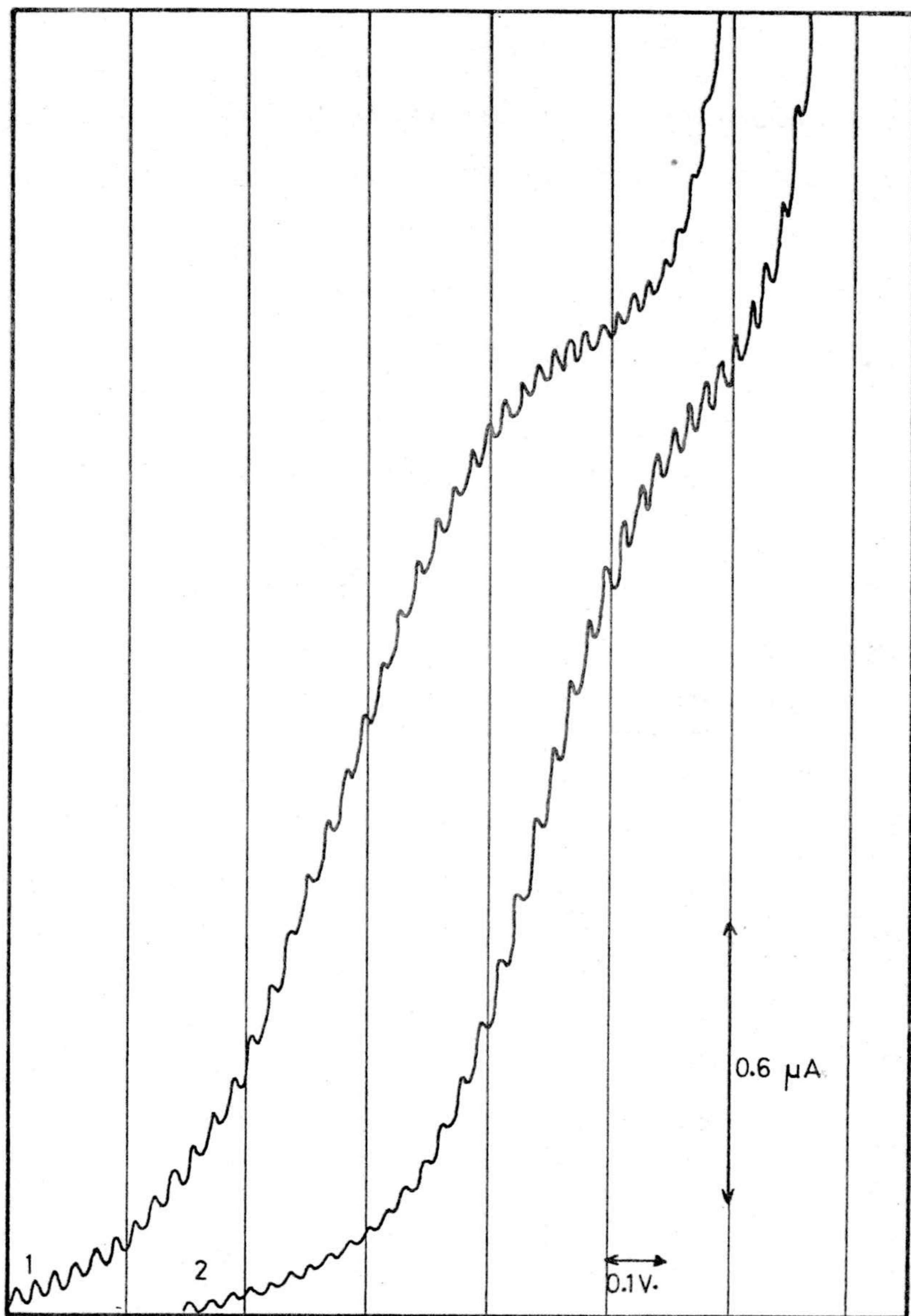


Fig. 26. Polarogramas de holo y apoenzima. 1) Apoenzima, $1,16 \cdot 10^{-5}$ M., pH 7. Potencial original de registro $-0,5$. 2) Holoenzima, $1,33 \cdot 10^{-5}$ M. Potencial original de registro: $-0,5$. en ambos casos se utilizó como fondo glicerofosfato $0,05$ M., pH 7.

que se usaron en polarografía y que se da en la figura 27.

Una razón de la imposibilidad de reducción del PLP sobre fosforilasa podría ser la misma que ha hecho que durante muchos años no se haya podido separar el PLP de la holoenzima, de una forma tal que al incubar con el mismo la apoenzima, ésta recuperara las propiedades de la enzima nativa, es decir, que el PLP está ocluido ("buried") en el interior de la cadena polipeptídica.

Hoy en día la apoenzima se prepara haciendo reaccionar - el PLP con cisteína, después de que éste se "expone" por medio de un tampón "deformante" a baja temperatura (79). Por - ello hemos intentado la reducción del PLP en presencia de citrato de imidazol a baja temperatura, pero sin añadir cisteína que se llevaría el PLP. El polarograma resultante se da en la figura 28 en la que se observa una onda a un potencial de semionda menos negativo que el obtenido para las ondas de fosforilasa y apofosforilasa en glicerofosfato (tabla VII), indicando que otra substancia electroactiva se está reduciendo en el electrodo, pudiendo ser, bien PLP libre, o - bien la base de Schiff. La proximidad de la onda catalítica hace imposible separar ambas ondas: esta última y la correspondiente a PLP libre o la base de Schiff.

El citrato de imidazol tanto a esta temperatura como a 25 °C. no produce apreciables efectos sobre la onda de la - apoenzima (figura 28) confirmando nuestra suposición. (tabla VIII).

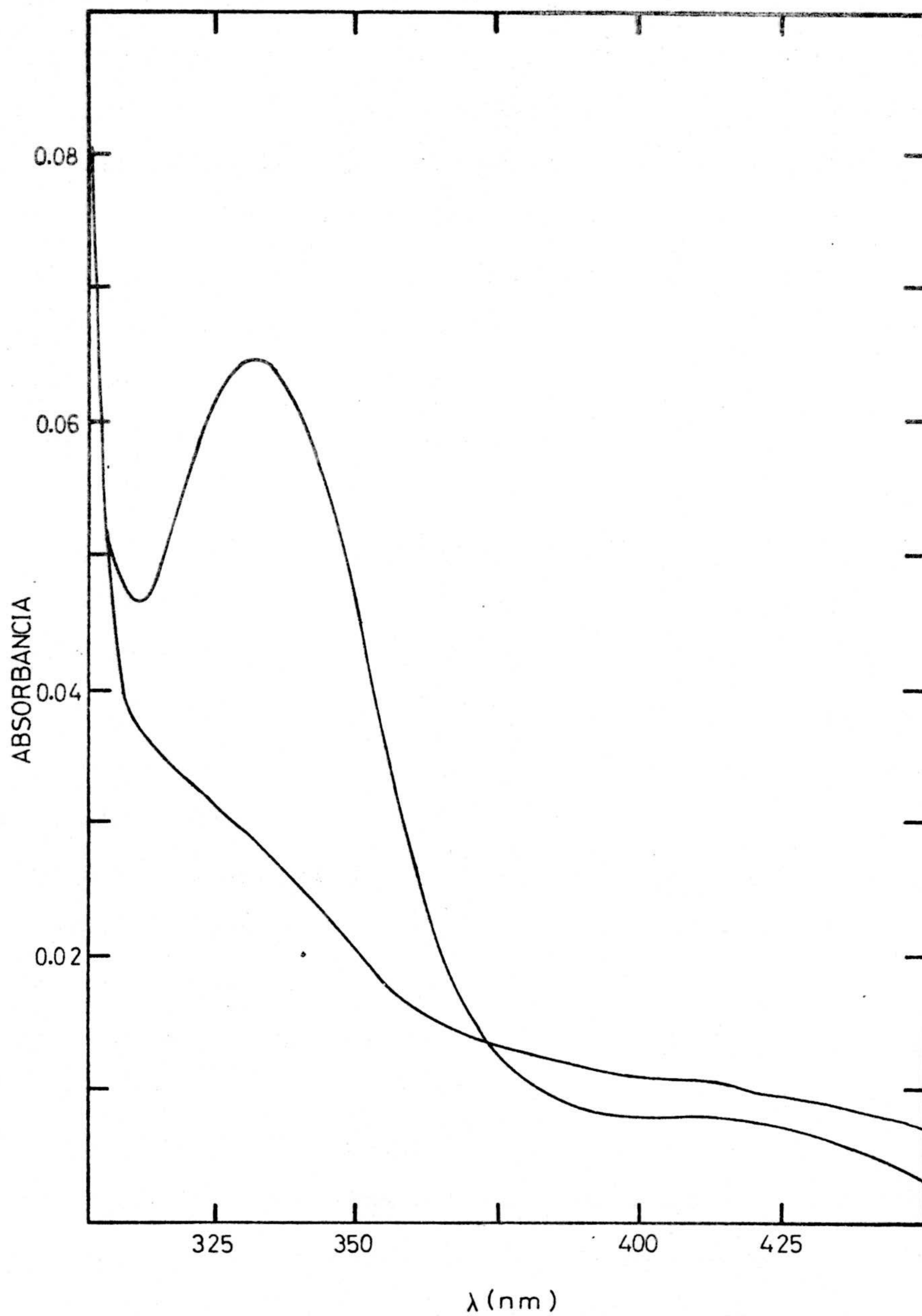


Fig. 27. Espectros de holofosforilasa y apofosforilasa en glicerofosfato 0,05 M. pH 7
holofosforilasa, $1,2 \cdot 10^{-5}$ M.
apofosforilasa, $1,16 \cdot 10^{-5}$ M.

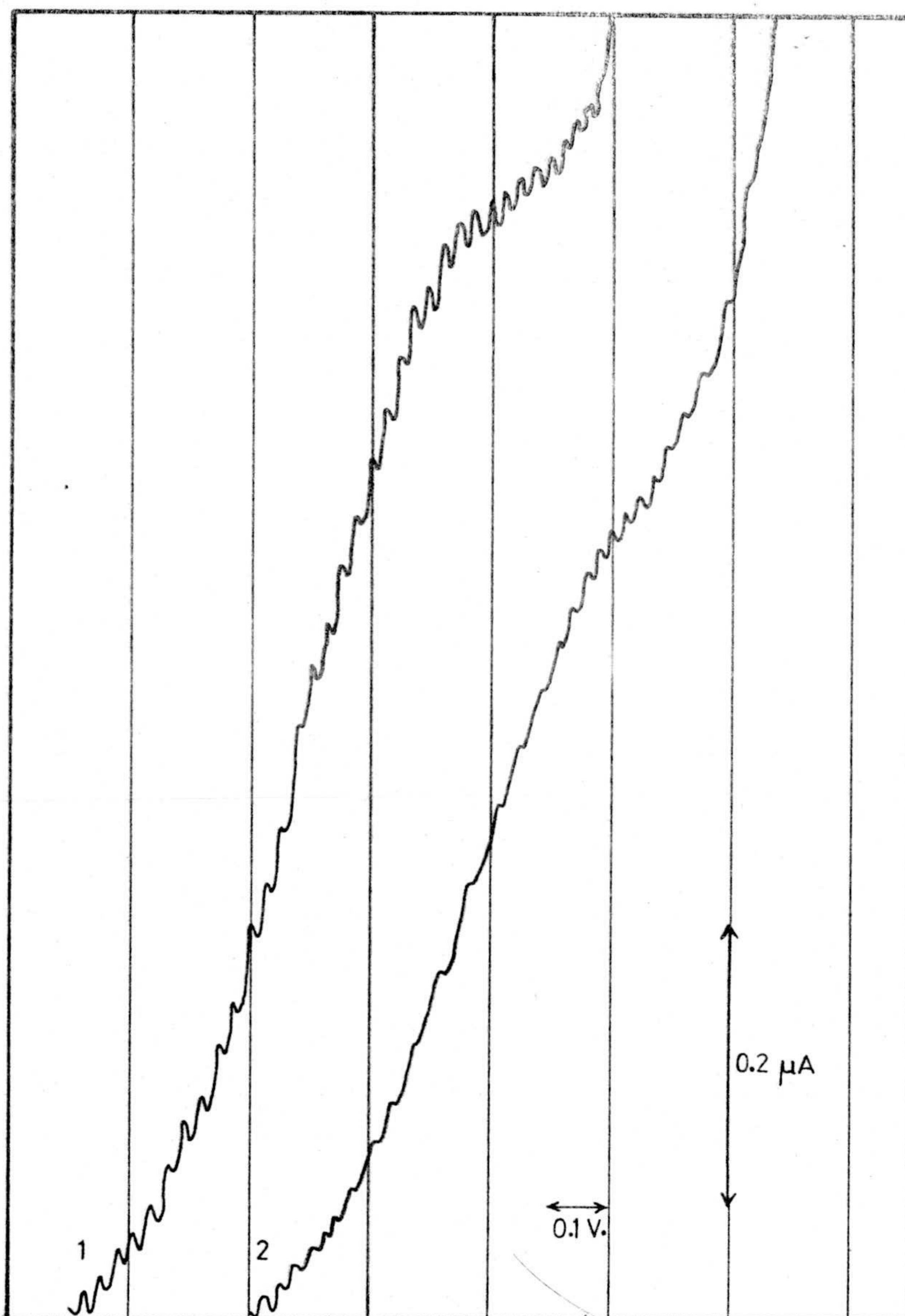


Fig. 28. Polarogramas de holofosforilasa y apofosforilasa en citrato de imidazol 0,4 M. pH neutro, $t = 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
 1) holofosforilasa, $8 \cdot 10^{-5}$ M. Potencial de registro original: -0,6
 2) apofosforilasa, $1,5 \cdot 10^{-5}$ M. Potencial de registro original: -0,8. Intensidad: la de la escala multiplicada por tres.

TABLA VIII

Polarografía de fosforilasa en citrato de imidazol.

enzima	$i(\mu A)$	$-E_{1/2}(v)$	t. °C.
holo	0,7	0,95	3
apo	1,7	1,07	3
apo	1,2	1,16	25

fosforilasa, $8 \cdot 10^{-5} M.$ en citrato de imidazol 0,4 M. pH neutro
 apofosforilasa, $1,5 \cdot 10^{-5} M.$, preparada según se describe en
 EXPERIMENTAL, en el mismo tampón.

Por último, merece un pequeño comentario el hecho de que la apoenzima presente una intensidad doble de la que presenta la holoenzima, cuando su concentración es unas cinco veces inferior. Ello podría atribuirse a las diferentes características oligoméricas, pues la apoenzima está en forma de tetramero en las condiciones del experimento, mientras que la holoenzima se encuentra en forma de dímero (106).

B) MODIFICACION QUIMICA
MEDIANTE EL USO DE TNM

1. Inactivación de la enzima por tratamiento con TNM.

En la figura 29 están resumidos los resultados de la inactivación de fosforilasa b al ser tratada con un exceso de TNM. Estos primeros experimentos fueron llevados a cabo utilizando relaciones molares TNM/fosforilasa, (TNM/F), así como tiempos de reacción, lo suficientemente grandes para un conocimiento inicial de la extensión de la reacción.

Las medidas de actividad eran realizadas tomando, a los tiempos deseados, una pequeña cantidad de la muestra de reacción y parando la misma añadiendo un exceso de diluyente de la enzima adecuadamente preparado para medir actividad.

En estos experimentos, se realizaron dos controles, uno de ellos (O) era una muestra de fosforilasa a la que no se añadió TNM, un segundo control (●) era una muestra de fosforilasa preservada de oxidación añadiendo un gran exceso de ME.

La muestra de fosforilasa utilizada como control en presencia de ME, mantenía su actividad original (●) a lo largo del transcurso de la reacción. En ausencia de ME (O) se perdía un 50% de la actividad, aproximadamente, en 24 horas, posiblemente como consecuencia de la oxidación de grupos -SH.

Las pérdidas de actividad a TNM/F=9,7 y 27,8 se han representado tomando como 100% la muestra en la que no se añadía ME con objeto de apreciar solamente el efecto del trata

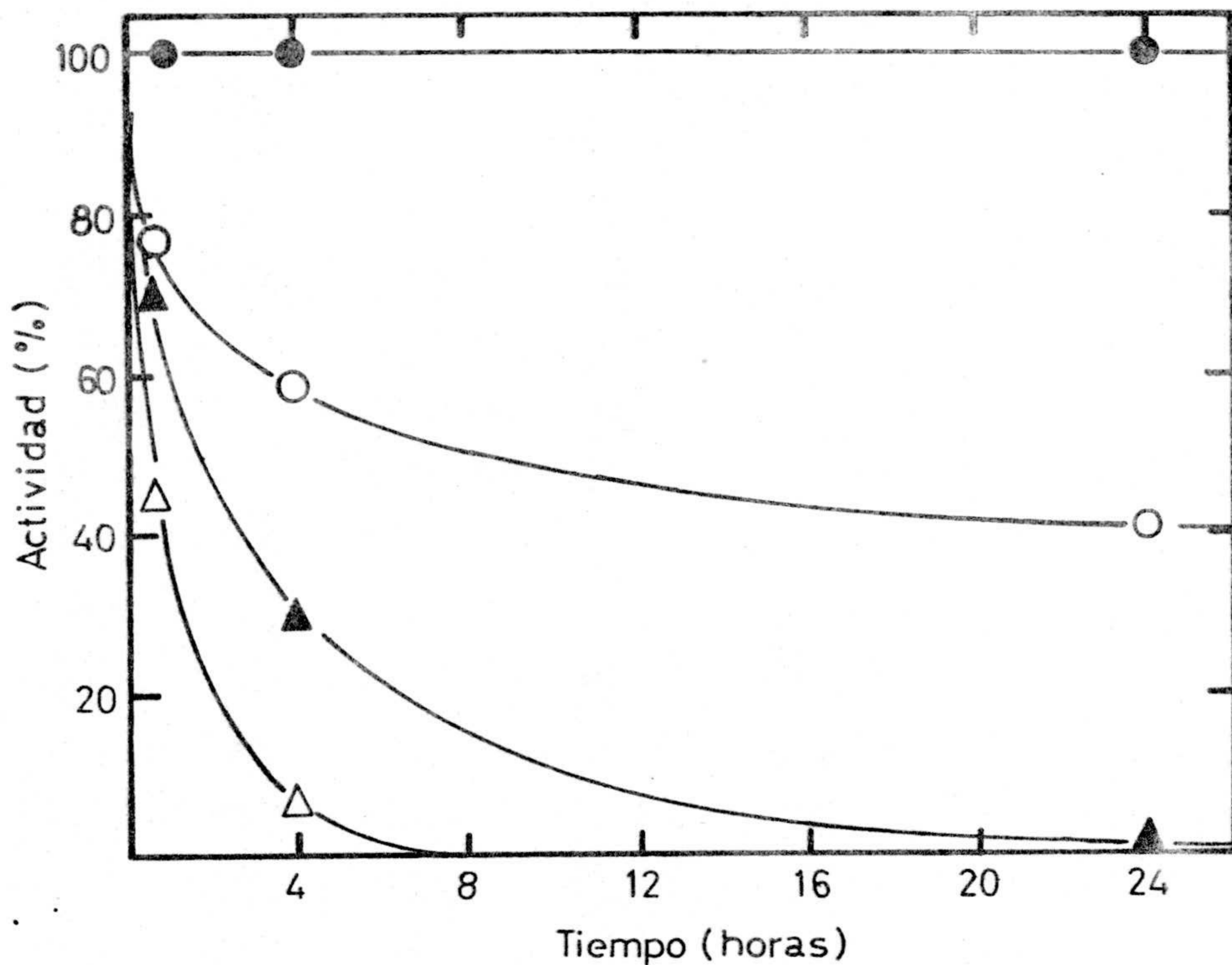


Fig. 29. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con TNM. % de actividad vs. tiempo de transcurso de reacción fosforilasa, $0,24 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M. pH 8 control en presencia de ME: ● — ● — ● — ... control sin ME: ○ — ○ — ○ — ... relación molar TNM/F = 9,2: ▲ — ▲ — ▲ — ... " " " = 27,8: △ — △ — △ — ...

miento con TNM.

Igualmente, se estudió la inactivación en función de la cantidad de TNM añadida (fig.30). El control en este caso era una muestra a la que no se añadió TNM y cuya actividad se medía a los tiempos indicados; respecto de este control se calculó el % de inactivación de las demás muestras.

La pérdida de actividad sufrida por el control al que no se añadió ME, y que suponemos debida a la oxidación de los grupos -SH de la enzima, hace suponer que la inactivación sufrida al tratar con TNM es debida a dos efectos: tratamiento con TNM y oxidación de los grupos -SH por el oxígeno del aire. Para que la inactivación fuera función únicamente del tratamiento con TNM, se planearon experimentos en los que la reacción se finalizaba añadiendo un exceso de ME, y a continuación se dejaba incubar en presencia de este reactivo durante 18 horas.

El resultado está resumido en la figura 31, en la que se puede observar que la muestra utilizada como control (TNM/F=0,0) y a la que no se añadió TNM recupera más del 50% de su actividad al incubar con ME, alcanzando los niveles de actividad usuales en fosforilasa. Esto confirma la suposición hecha anteriormente de que la pérdida del control, de actividad con el tiempo era consecuencia de la oxidación de los grupos -SH por el oxígeno del aire.

Las muestras que habían sido tratadas con TNM no recuperaban prácticamente su actividad por incubación con ME. Esto nos permite afirmar que la inactivación en este caso es solo

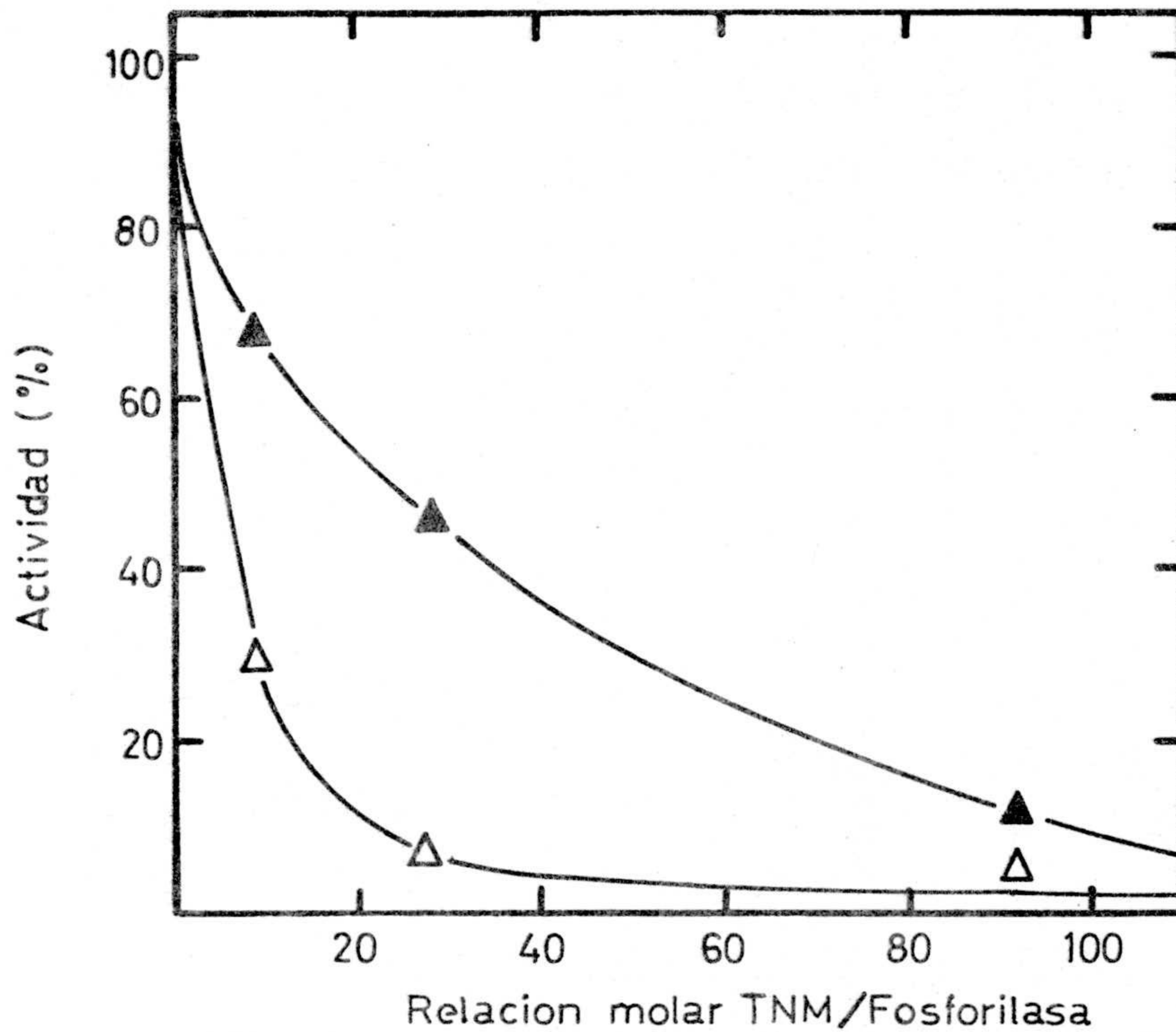


Fig. 30. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con TNM
 % de actividad vs. relación molar TNM/F
 fosforilasa, $0,24 \cdot 10^{-5}$ M. en tris-Cl⁻ 0,05 M. pH 8
 tiempo de reacción = 30 min.: ▲ — ▲ — ▲ — ...
 tiempo de reacción = 4 horas: △ — △ — △ — ...

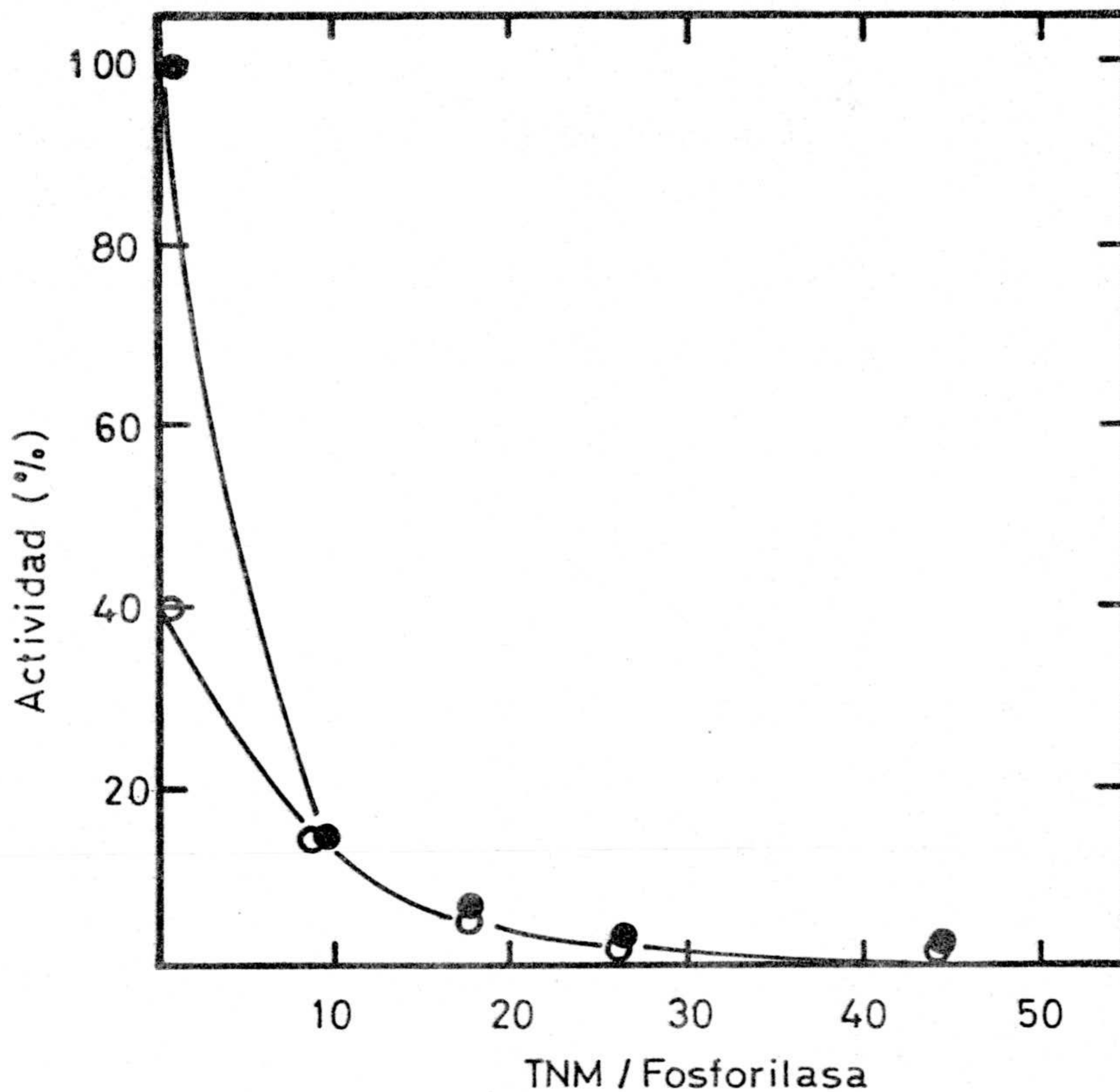


Fig. 31. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con TNM
 % de actividad vs. relación molar TNM/F
 fosforilasa, $0,28 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M. pH 8
 inactivación a las cuatro horas de reacción: ○ — ○
 — ○ — ...
 inactivación a las cuatro horas de reacción y dieciocho de incubación con ME: ● — ● — ● — ...
 los tantos por ciento de actividad se calcularon respecto de la actividad original, antes de añadir TNM.

función del tratamiento con TNM. Acerca de la naturaleza de este tratamiento se podría suponer, en un principio, que consiste en una nitración de los restos tirosina de la enzima, y si tenemos en cuenta que la inactivación de la enzima por tratamiento de la misma con otros reactivos de cisteínas(40) es reversible por incubación con un tiol de bajo peso molecular como el ME, también podríamos suponer que los grupos -SH (al menos aquellos que influyen en la actividad) no son afectados por un tratamiento con TNM como el que se ha descrito, responsabilizando, de esta forma, a la nitración de la tirosina de la inactivación de la enzima.

Con objeto de disponer de más información a relaciones molares TNM/F menores, así como para estudiar la influencia del tiempo de incubación se planearon experimentos en los - que la incubación con ME fue realizada por tiempos inferiores a 18 horas, comprobándose que la recuperación de actividad de los controles era prácticamente total para 2-4 horas de incubación con dicho reactivo. Igualmente se obtuvieron - decaimientos de actividad usando relaciones molares TNM/F - desde 1 hasta 10(fig.32). Cuando se utilizaban relaciones molares TNM/F inferiores a 10, no se conseguía una total pérdida de actividad, aún después de cinco horas de reacción, alcanzándose una inactivación límite a partir de las tres horas de reacción aproximadamente; fig. 33.

Podemos decir, entonces, que la inactivación de la enzima, función únicamente del tratamiento con TNM, era total para relaciones molares TNM/F = 10-12 y usando tiempos de reacta

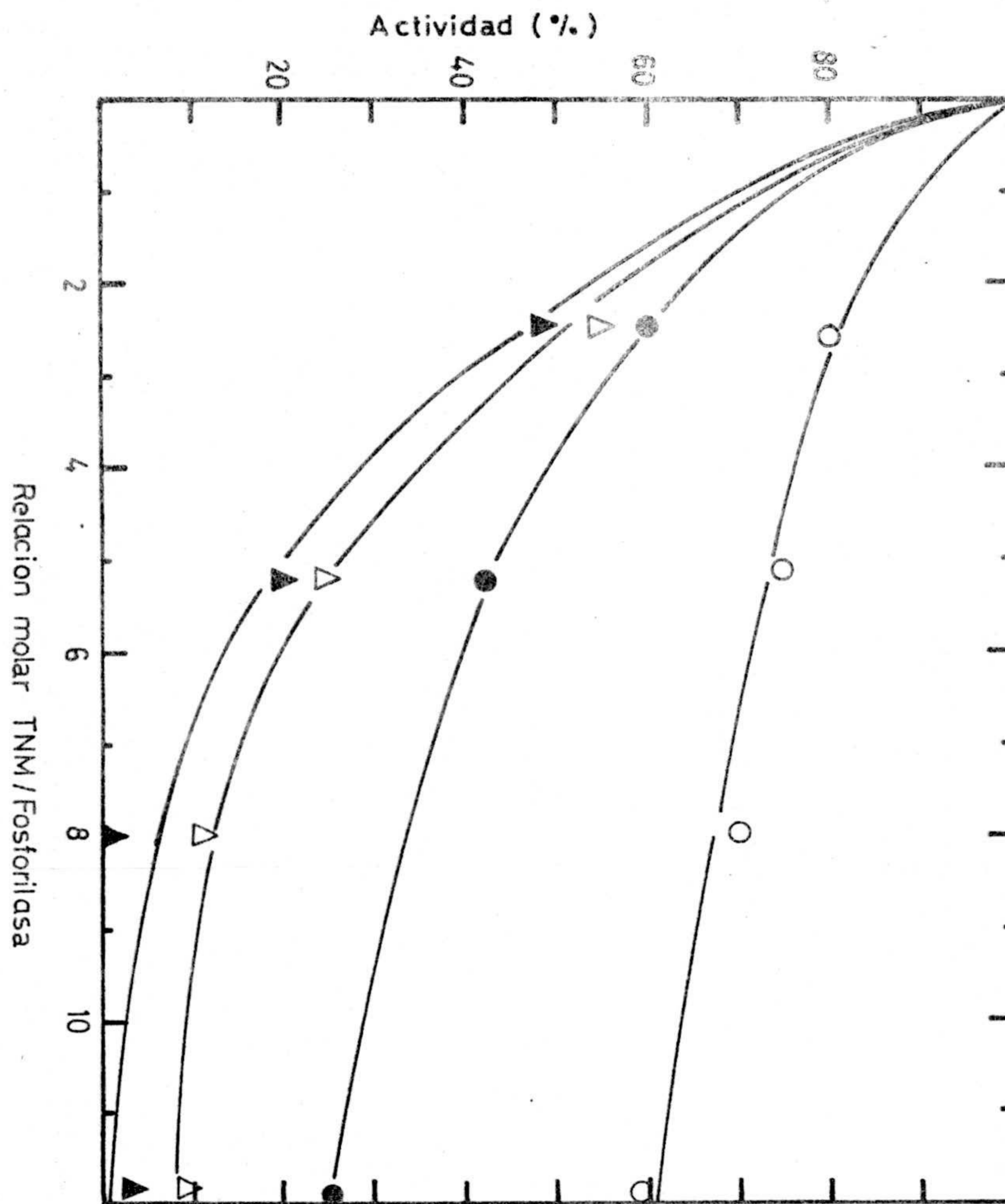


Fig. 32. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con TNM
 % de actividad vs. relación molar TNM/F
 fosforilasa, $0,79 \cdot 10^{-5}$ M., tris- Cl^- 0,05 M. pH 8
 tiempo de reacción = 20 min.: ○ — ○ — ○ — ...
 " " 50 " : ● — ● — ● — ...
 " " 135 " : △ — △ — △ — ...
 " " 270 " : ▲ — ▲ — ▲ — ...

La reacción se paraba añadiendo ME hasta una
 concentración final 0,03 M., y se incubaba en este
 medio durante dos horas

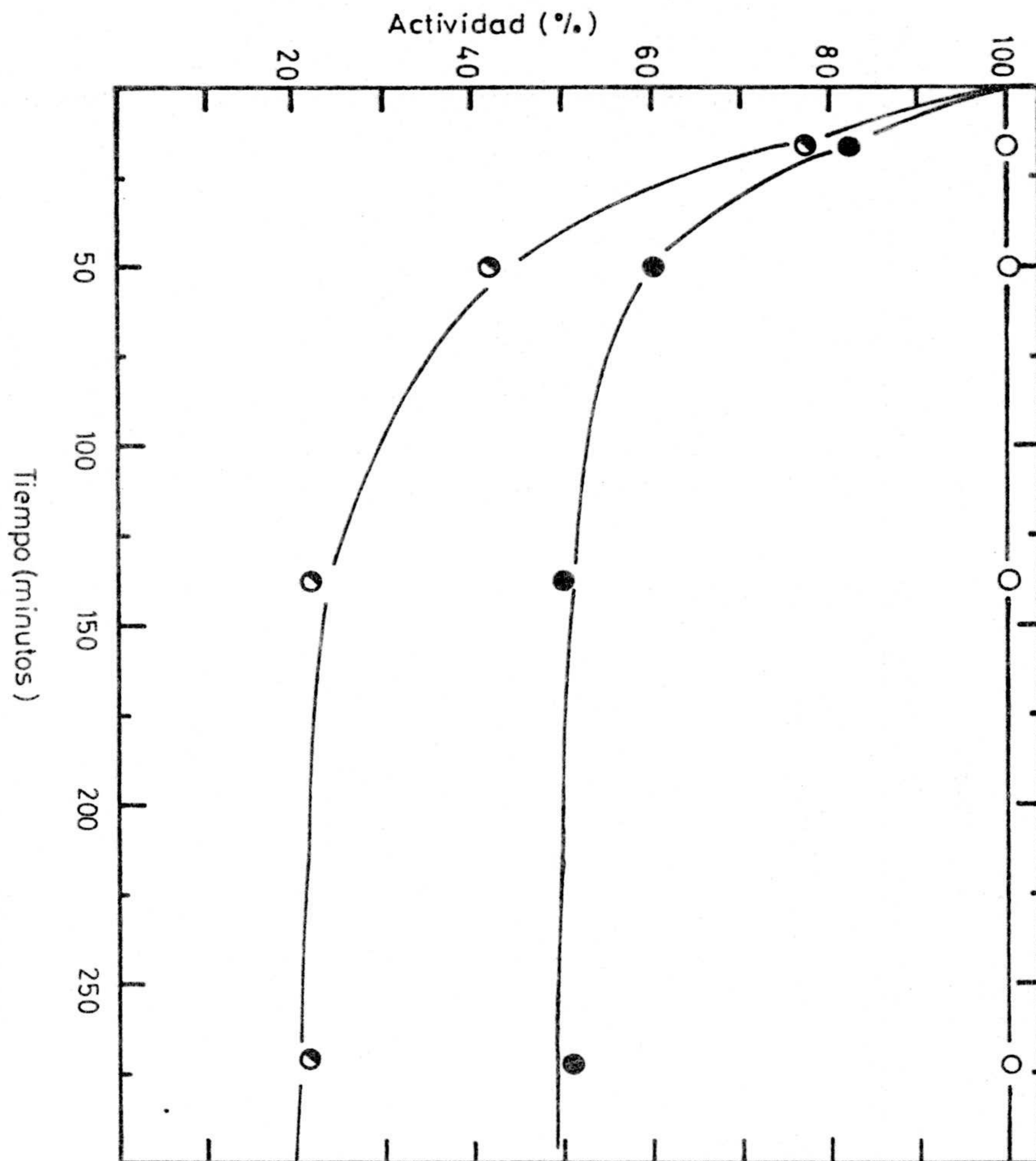


Fig. 33. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con TNM
 % de actividad vs. tiempo de reacción
 fosforilasa, $0,79 \cdot 10^{-5}$ M., tris- Cl^- 0,05 M. pH 8
 relación molar TNM/F = 0,0: ○ — ○ — ○ — ...
 " " " 2,6: ● — ● — ● — ...
 " " " 6,0: ◐ — ◐ — ◐ — ...

La reacción se paraba añadiendo ME hasta una concentración final 0,03 M., y se incubaba en este medio durante dos horas.

ción de 120-150 minutos.

2. Influencia del efector alostérico, AMP, sobre la inactivación. Como ya se ha dicho en páginas anteriores, la fosforilasa b presenta una absoluta dependencia del AMP para su actividad. La unión de este efector alostérico a la fosforilasa produce un cambio de conformación en la enzima, lo suficientemente intenso como para modificar apreciablemente muchas características de la misma, oligoméricas, accesibilidad del sitio del PLP, etc.

Es de suponer, por consiguiente, que la presencia de AMP debe afectar los resultados de la inactivación de la enzima tratada con TNM. Para conocer este efecto del AMP, se prepararon experimentos en los que antes de añadir TNM a las muestras, éstas habían sido incubadas unos minutos con AMP, de manera que la concentración final del efector era $2 \cdot 10^{-3} M$.

Efectivamente, como se puede apreciar en la figura 34, utilizando relaciones molares TNM/F lo suficientemente pequeñas, la enzima es protegida totalmente de la inactivación en presencia de AMP. Al aumentar la relación TNM/F utilizada, la protección por el AMP es menos efectiva, aunque de todas formas no se alcanzan los niveles de inactivación obtenidos en ausencia del efector.

En la figura 35 están resumidos los resultados de la inactivación en presencia de AMP. En las condiciones en que se consigue una total pérdida de actividad (figura 32), la presencia de AMP protege a la enzima de forma que únicamente se consigue un 50% de la inactivación, aproximadamente.

Estos resultados podrían interpretarse al menos de tres

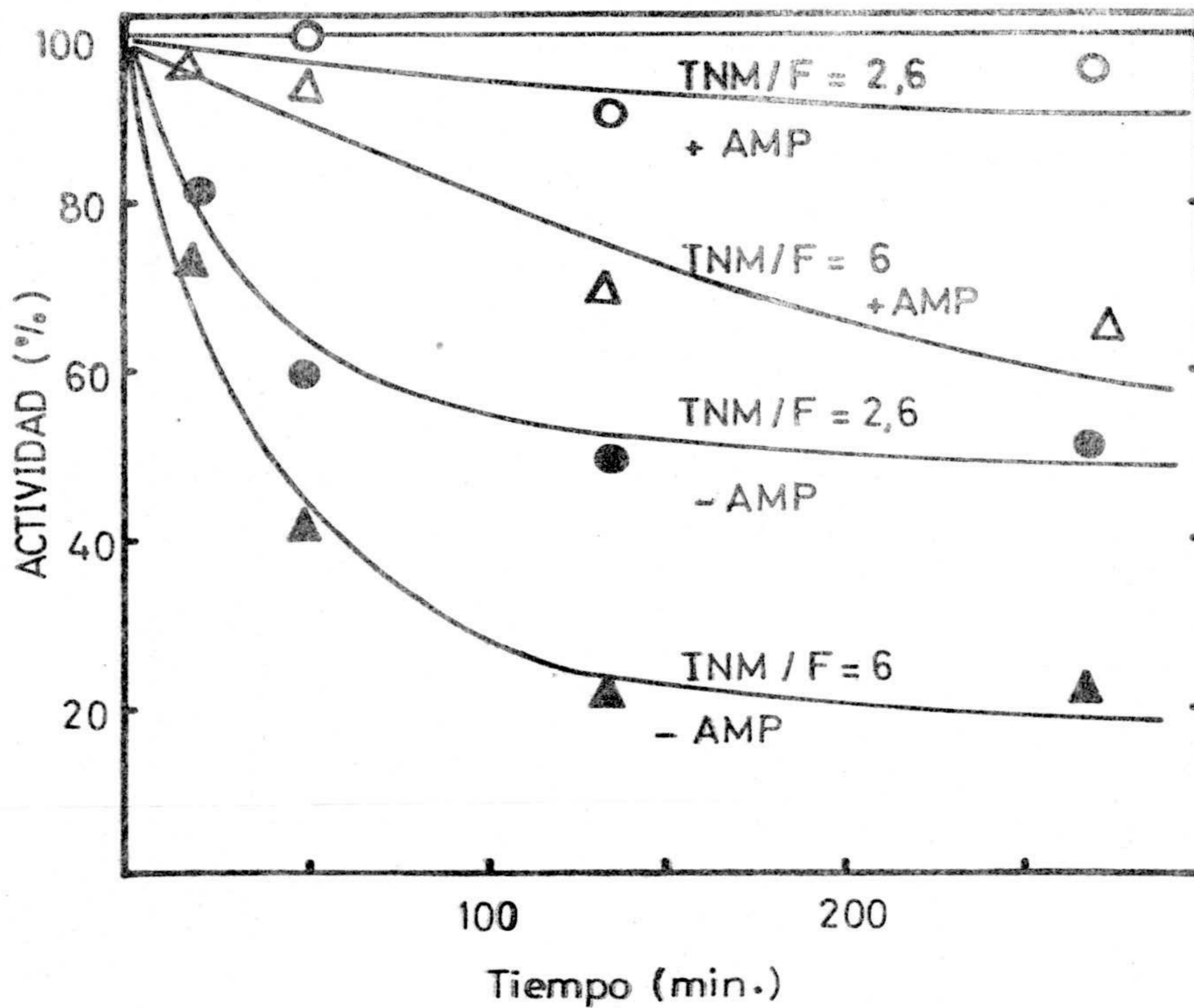


Fig. 34. Efecto del AMP sobre la inactivación de la fosforilasa tratada con TNM.
 fosforilasa, $0,8 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05M., pH 8
 control: mantenía una actividad del 100 %
 TNM/F = 2,6; AMP, 2mM.: \circ — \circ — ...
 TNM/F = 2,6; sin AMP: \bullet — \bullet — ...
 TNM/F = 6,0; AMP, 2 mM.: Δ — Δ — ...
 TNM/F = 6,0; sin AMP: \blacktriangle — \blacktriangle — ...

La reacción se paraba añadiendo ME hasta una concentración final 0,03 M., y se incubaba en este medio durante dos horas.

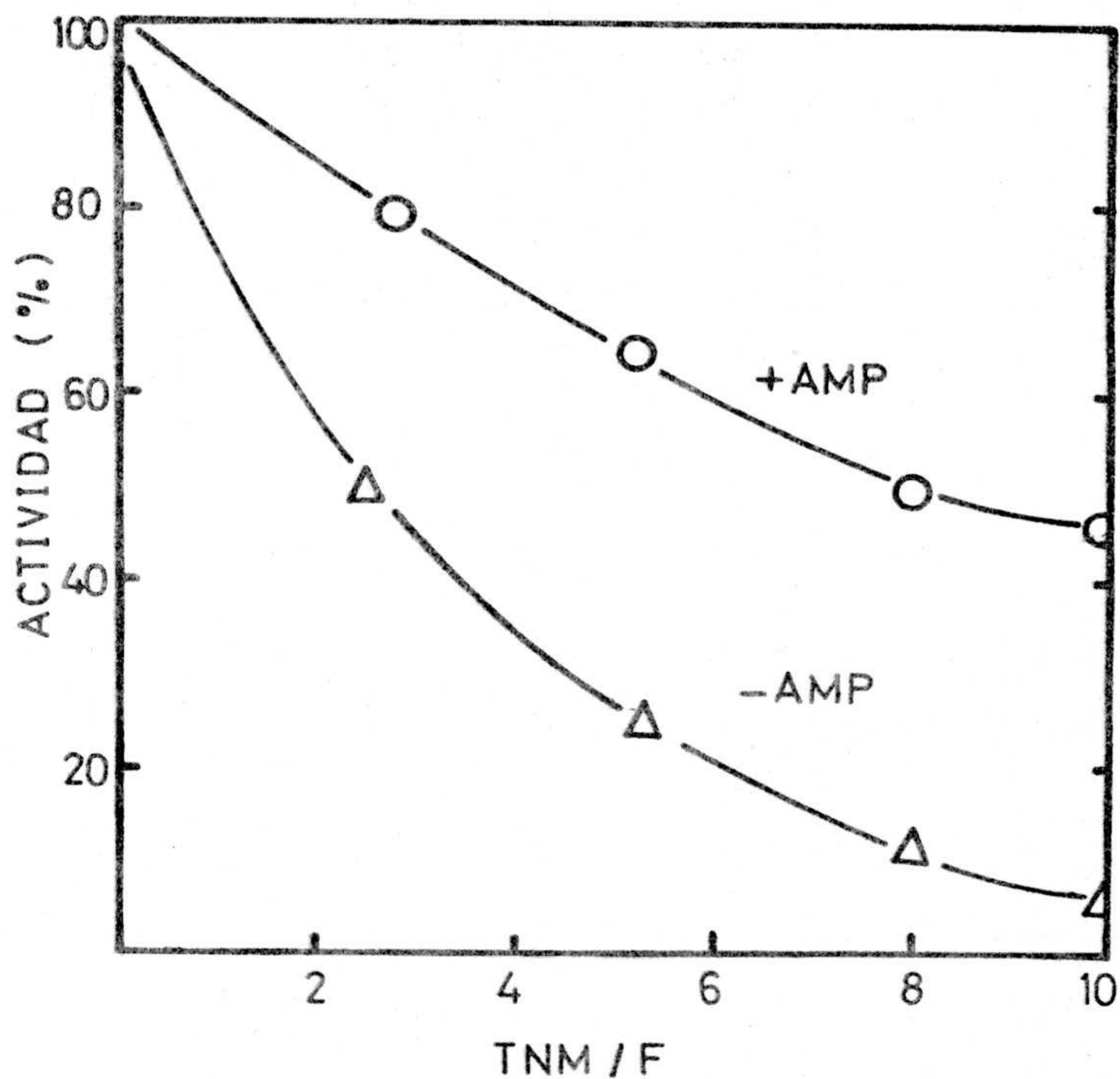


Fig. 35. Efecto del AMP sobre la inactivación de la fosforilasa tratada con TNM.
 fosforilasa, $0,8 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., pH 8
 control: mantenía una actividad del 100 %
 AMP, 2 mM., a los 135 min. de reacción: $\circ - \circ - \dots$
 sin AMP, a los 135 min. de reacción: $\Delta - \Delta - \dots$
 La reacción se paraba añadiendo ME hasta una concentración final 0,03 M., y se incubaba en este medio durante dos horas

formas:

a) En el sitio de unión del AMP a la fosforilasa hay implicado un resto de tirosina. La presencia de AMP, evitaría de algún modo la nitración de ese resto de tirosina, y por lo tanto, la pérdida de toda la actividad.

b) El TNM reacciona irreversiblemente con los grupos -SH de la fosforilasa, siendo la inactivación debida a la oxidación de los mismos. La presencia de AMP protege parcialmente a los grupos -SH y, por consiguiente, preserva a la enzima de la inactivación total.

c) Estan sucediendo simultáneamente ambos efectos citados anteriormente.

Con objeto de resolver las anteriores alternativas, se procedió a la determinación del número de residuos de tirosina y de cisteina que habían sido modificados en el tratamiento con TNM.

3. Determinación del número de tirosinas modificadas.

Como ya se ha indicado en EXPERIMENTAL, los grupos o-nitrotirosina formados pueden ser determinados midiendo su absorbancia a 428 nm., en medio básico, o a 360 nm., en medio ácido.

A continuación describimos el procedimiento utilizado para la caracterización y determinación de los grupos o-nitrotirosina formados:

Se preparaba una disolución de fosforilasa libre de AMP en tris-Cl⁻, 0,05 M.; EDTA, 2 mM., pH 7, pasando por una columna de sephadex G-25; la concentración de esta disolución era del orden de 4 mg/ml. Esta disolución de fosforilasa era dividida en dos porciones, que llamaremos I y II. A la muestra II se añadía TNM y a la muestra I, la misma cantidad de etanol (el TNM utilizado era 0,84 M. en etanol del 95%). A partir de aquí ambas muestras eran sometidas exactamente al mismo tratamiento de forma que la muestra I nos servía como control.

A las dos horas y media de haberse iniciado la reacción con TNM, era parada añadiendo un gran exceso de ME, permitiendo la incubación en estas condiciones como ya se ha descrito.

Antes de eliminar los iones nitroformiato, pasando por una columna de sephadex G-25, las muestras eran concentradas, previamente, para evitar una excesiva dilución de las mismas:

Después de la incubación con ME ambas muestras se precipitaban añadiendo sulfato amónico hasta un 50% de saturación. La enzima precipitada se centrifugaba en la cámara fría a -

20.000g, durante 20 minutos; el precipitado se disolvía en una mínima cantidad de tampón y entonces se pasaba por sephadex G-25.

Las muestras eluidas se precipitaban mediante la adición de ácido perclórico hasta una concentración final 0,3 N. El precipitado se centrifugaba a 20.000g durante 15 minutos. y, después de lavado dos veces con agua destilada, era disuelto en guanidina 7,5 M. Esta operación se llevaba a cabo con objeto de eliminar el PLP, ya que la medida y caracterización de los residuos de o-nitrotirosina en su presencia (figura 36) se hacía muy difícil dadas las características espectrales del cofactor.

Ambas muestras, I y II, se disolvían en guanidina y allí - cuotas de ambas eran utilizadas, previa dilución, en la determinación espectrofotométrica del número de o-nitrotirosinas.

En la figura 37 se da, a título de ejemplo, un espectro de o-nitrotirosina de fosforilasa marcada utilizando como referencia la muestra de fosforilasa utilizada como control. La banda obtenida a pH ácido presenta, con respecto a la obtenida a pH alcalino, un coeficiente de extinción algo superior - al encontrado en la bibliografía con compuestos modelo (56). Esto podría ser debido a un comportamiento diferente del cromóforo en dichos compuestos modelo, un error en la bibliografía o a la presencia de algunos iones nitroformiato que no se hubieran eliminado totalmente en la filtración con gel de sephadex. En la figura 38 damos un espectro de los iones nitroformiato que se forman en el transcurso de la reacción. Como

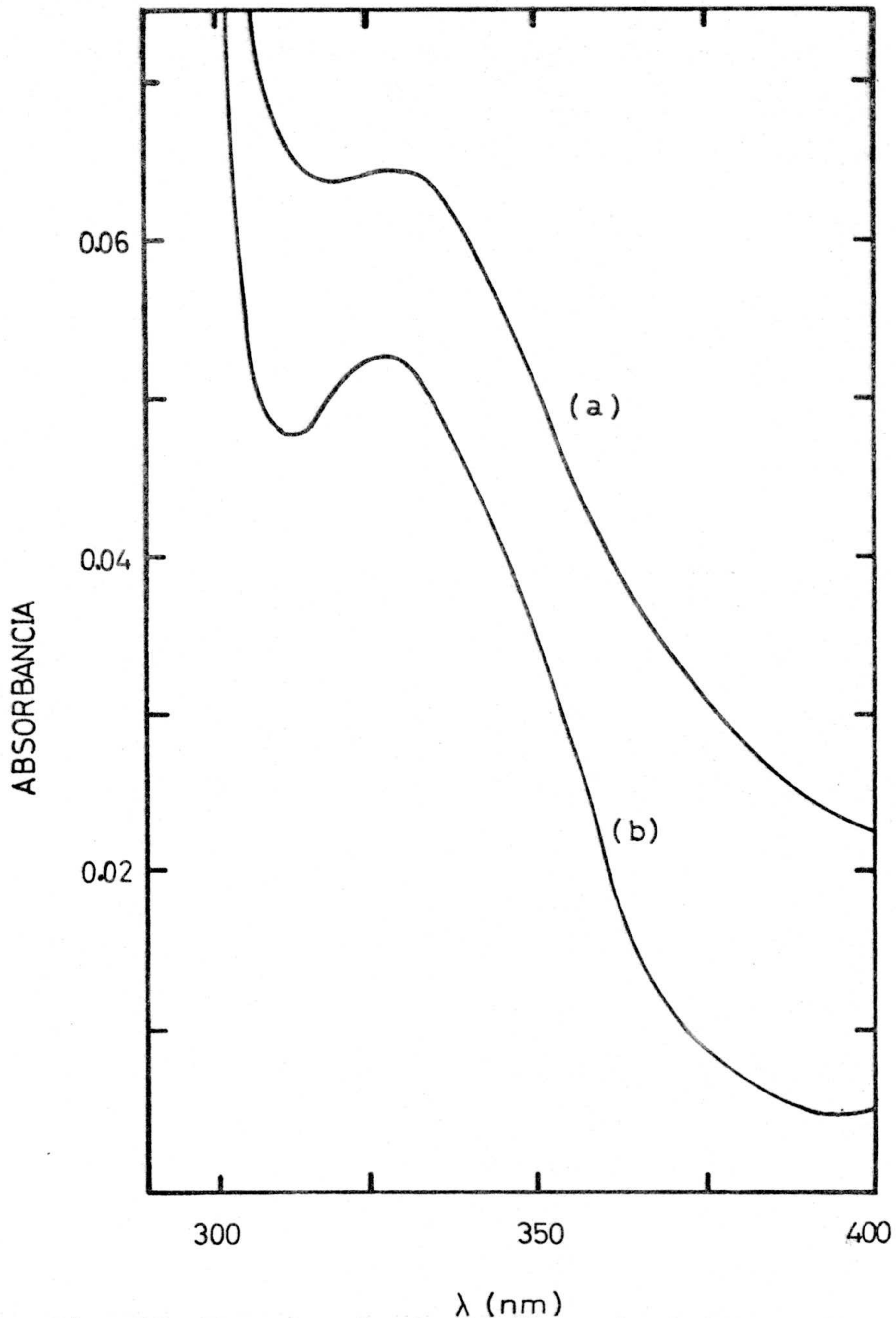


Fig. 36. Espectro de fosforilasa tratada con TNM
 (a) relación molar TNM/F = 10
 (b) no tratada
 en ambos casos, fosforilasa, $0,7 \cdot 10^{-5}$ M.

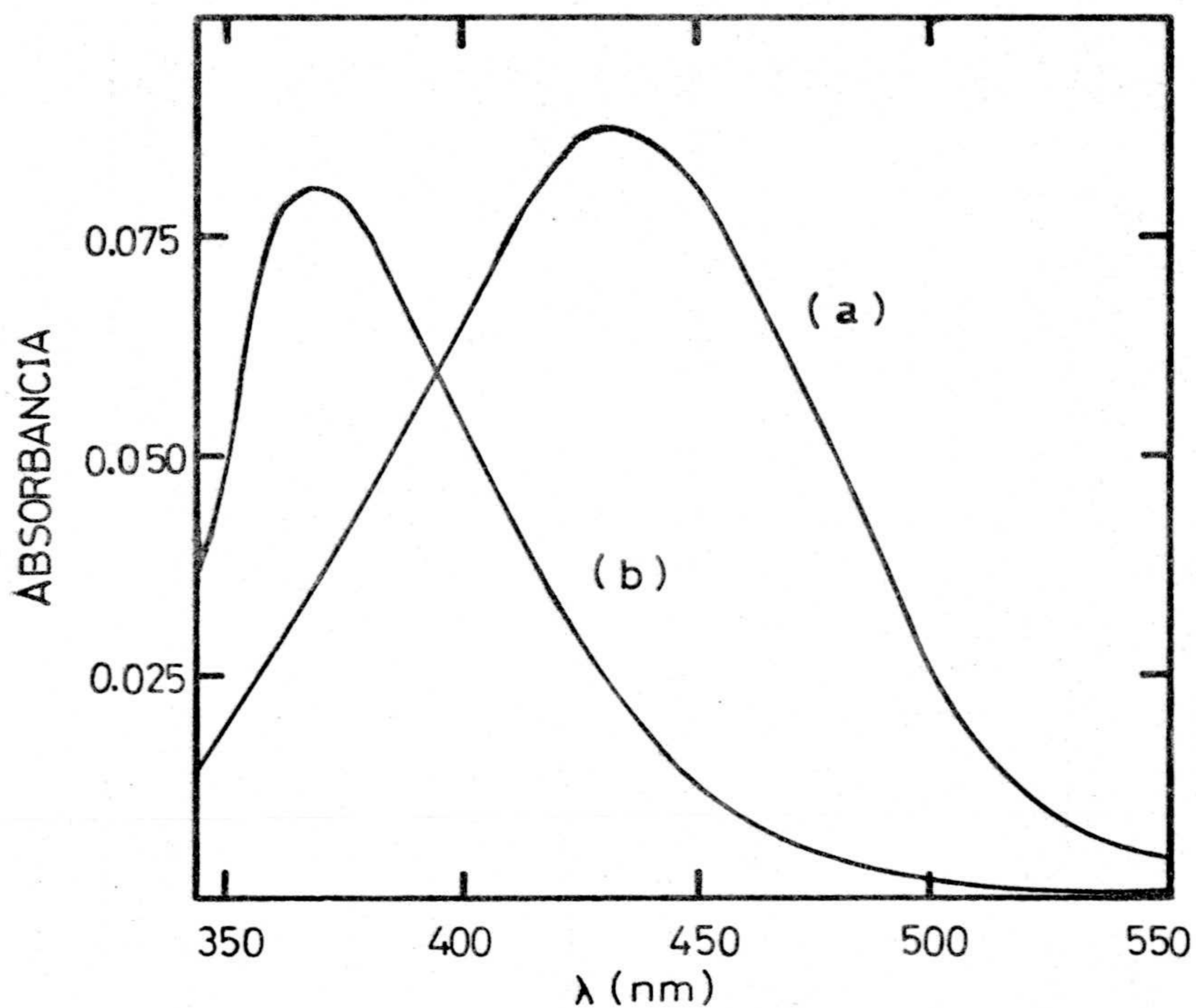


Fig. 37. Espectro de o-nitrotirosina.
 fosforilasa tratada con TNM vs. no tratada
 (a) pH alcalino
 (b) pH ácido
 fosforilasa, $2,6 \cdot 10^{-5}$ M. en guanidina, 3 M.;
 tris- Cl^- , 0,025 M.; EDTA, 1 mM. pH 7
 relación molar TNM/F = 10.

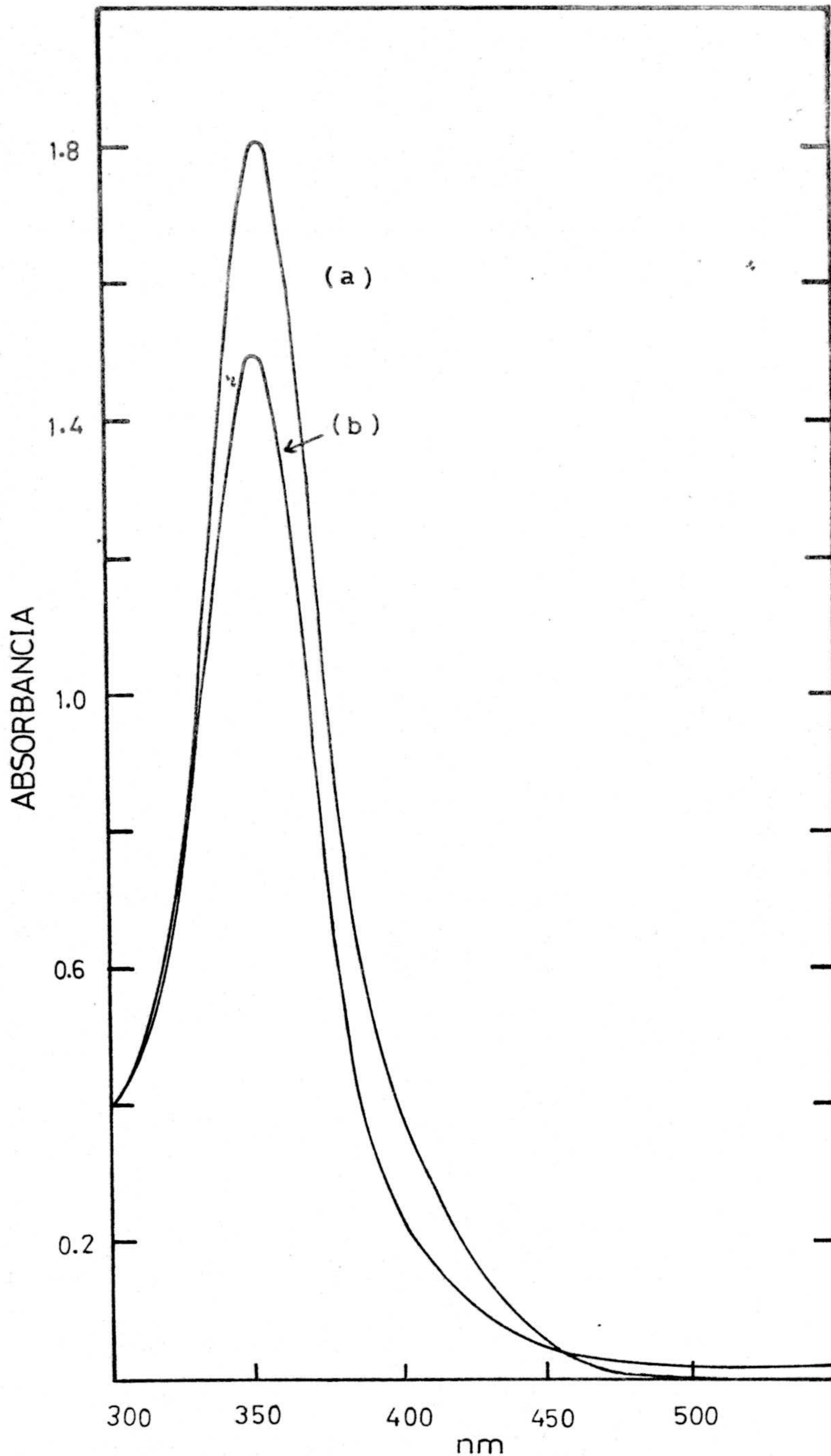


Fig. 38. Espectro de iones nitroformiato.

(a) pH alcalino

(b) pH ácido

Este espectro se realizó con el eluyente de la columna de sephadex G-25 después de pasar por la misma la fosforilasa tratada con TNM.

se puede observar, los iones nitroformiato presentan un máximo de absorción a 350 nm. con un coeficiente de extinción ($\epsilon = 14.400$) (96), muy grande comparado con el de los restos de o-nitrotirosina a pH ácido. Esta banda de absorción no se modifica con el pH.

Por estas razones, la determinación del número de o-nitrotirosinas era realizada utilizando el máximo a 428 nm. - que aparece a pH alcalino. De la figura 37, el número de tirosinas modificadas por subunidad de enzima era calculado según se indica en EXPERIMENTAL.

Los resultados de la determinación del número de nitrotirosinas están resumidos en la figura 39, mostrando que para conseguir la modificación de un resto de tirosina, es necesario utilizar una relación TNM/F , como mínimo, igual a 10, para los tiempos usados (2 horas).

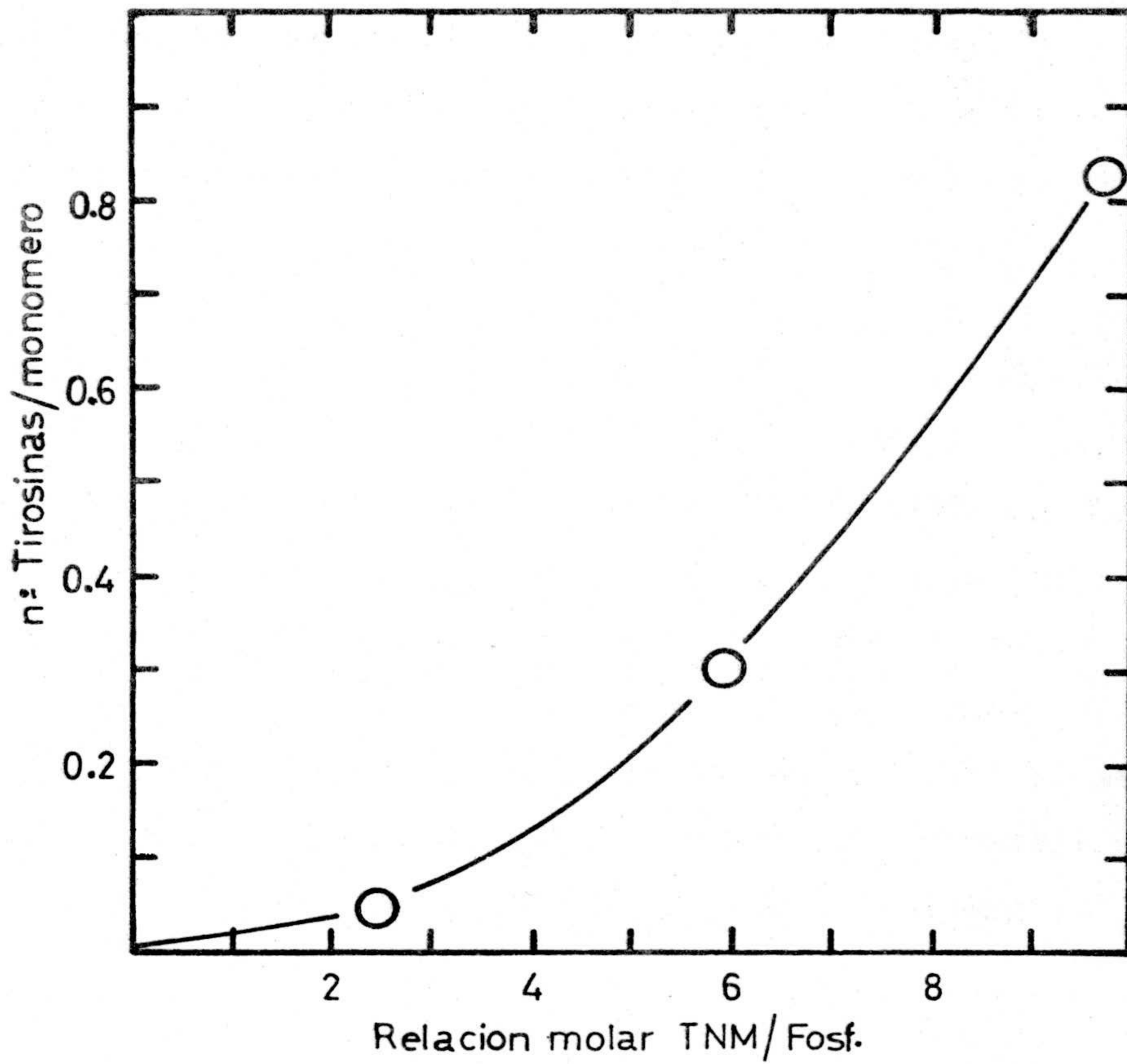


Fig. 39. Número de tirosinas modificadas en función de la relación molar TNM/F. tiempo de reacción: 2 h. Cada punto fue determinado como se ha descrito en los resultados expuestos.

4. Determinación del número de cisteínas modificadas.

Como se ha dicho en el capítulo EXPERIMENTAL , la determinación del número total de grupos -SH de la enzima, se llevaba a cabo mediante la disolución de la misma en guanidina de forma que se consiguiera la apertura de la proteína con la consiguiente exposición de todos los grupos -SH a la disolución.

Antes de proceder a la cuantificación de grupos -SH en fosforilasa marcada, se llevó a cabo un estudio de las condiciones experimentales necesarias con fosforilasa nativa. La determinación espectrofotométrica del número de grupos -SH, se realizaba de la siguiente forma:

En la célula de muestra se colocaba una disolución de fosforilasa en guanidina a pH neutro. La misma cantidad de disolución de guanidina era colocada en la célula de referencia. Después de ajustar a cero la absorbancia a 412 nm. una cantidad de DTNB era añadida a cada célula de forma que la concentración final de DTNB en cada una era la misma.

En la tabla IX se da el número de grupos -SH/monómero calculados en fosforilasa nativa a diversas concentraciones de guanidina, DTNB y fosforilasa.

Como se puede observar, el número máximo de grupos -SH/monómero calculado es 8. Este número está de acuerdo con el encontrado por algunos investigadores (40), sin embargo la cifra de nueve grupos -SH/monómero también ha sido encontrada en la bibliografía (37). Estas diferencias podrían explicarse como consecuencia de los distintos coeficientes de ex-

tinción usados(1,18 - 1,32) para la fosforilasa así como las distintas masas moleculares consideradas para un monómero de la enzima(90.000 - 100.000). Igualmente, la oxidación de alguno de los grupos -SH, en el transcurso del experimento y a los que hemos llamado rápidos en función de su reactividad con DTNB, por el oxígeno del aire, podría ser la razón de que la cifra resultante pueda oscilar entre 7,5 y 9. Este hecho ha sido encontrado en otros laboratorios e incluso Radda et al. (97) hace un corto comentario sobre la influencia de la incubación con diversos tioles en dicho número.

TABLA IX

Número de grupos -SH/monómero valorados a diversas concentraciones de guanidina, DTNB y enzima.

guanidina (M)	DTNB (mM)	fosf.(M)	-SH
5,0	0,47	0,73.10 ⁻⁵	7,6
2,9	0,24	0,50 "	7,5
5,5	0,24	0,62 "	7,7
5,2	0,23	0,71 "	7,7
4,9	0,23	0,83 "	7,7
6,5	0,21	0,32 "	8,0
1,7	0,12	0,31 "	7,5

De todas formas, siempre que se ha determinado el número total de grupos -SH valorables en la enzima tratada con TNM, este número ha sido calculado a partir del número de grupos

-SH en la enzima no tratada que se usara como control.

Los experimentos para medir el número de grupos -SH en la fosforilasa tratada con TNM se llevaban a cabo haciendo el tratamiento con dicho reactivo en las condiciones de tiempo de reacción e incubación con ME que se han descrito, salvo que el tampón se ajustaba a pH 7.

El exceso de reactivo y los productos de reacción eran eliminados mediante una columna de sephadex G-25. Los resultados de esta determinación están resumidos en la Tabla X.

TABLA X

Número de grupos -SH modificados por tratamiento con TNM

relación molar TNM/F	grupos -SH modificados
$3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$
$6 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$
$10 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$

experimentos realizados en tris-Cl⁻ 0,05 M., EDTA 2 mM., pH 7. tiempo de reacción: 2 horas más 2 horas de incubación con ME.

Cada uno de los valores de esta tabla es el resultado medio de, al menos, tres o cuatro determinaciones llevadas a cabo en diferentes experimentos, siempre en las mismas condiciones. Como se puede comprobar en la tabla X, cuando la relación molar TNM/F se hacía igual a 10, se habían valorado prácticamente cuatro grupos -SH por monómero de enzima.

Esto está de acuerdo con el hecho de que para esta relación, $TNM/F = 10$, al término de la reacción, aparecía una ligera turbidez en la mezcla de reacción, que era eliminada por centrifugación antes de pasar por la columna de sephadex G-25, y que debería estar relacionada con la precipitación que ocurre a la enzima después que ésta se disocia en monómeros cuando se han valorado los dos grupos $-SH$ que se han clasificado como "lentos".

Teniendo en cuenta que la modificación de los grupos $-SH$ no era reversible por incubación de la enzima con ME, se desechó la posibilidad de que el resultado de la modificación fuera la formación de disulfuros. Como se ha dicho en EXPERIMENTAL, el posible producto de reacción de los grupos $-SH$ con el TNM sería ácido cisteico, cuya formación se ve favorecida a pH alcalino. Por esta razón los experimentos de determinación de o-nitrotirosinas y grupos $-SH$ modificados se llevaron a cabo a pH 7.

Con objeto de poder comparar estos últimos resultados con aquellos de inactivación, se estudió la influencia del pH sobre las curvas de decaimiento de actividad. Prácticamente no había variaciones significativas, entre pH 7 y pH 8, en la pérdida de actividad de la enzima por tratamiento con TNM.

Un simple análisis de los resultados obtenidos nos permite asegurar que la inactivación de la enzima por tratamiento con TNM, podría ser consecuencia de la modificación de los grupos $-SH$ de la fosforilasa. En la figura 40, para mayor comodidad representamos las curvas de inactivación de la enzi-

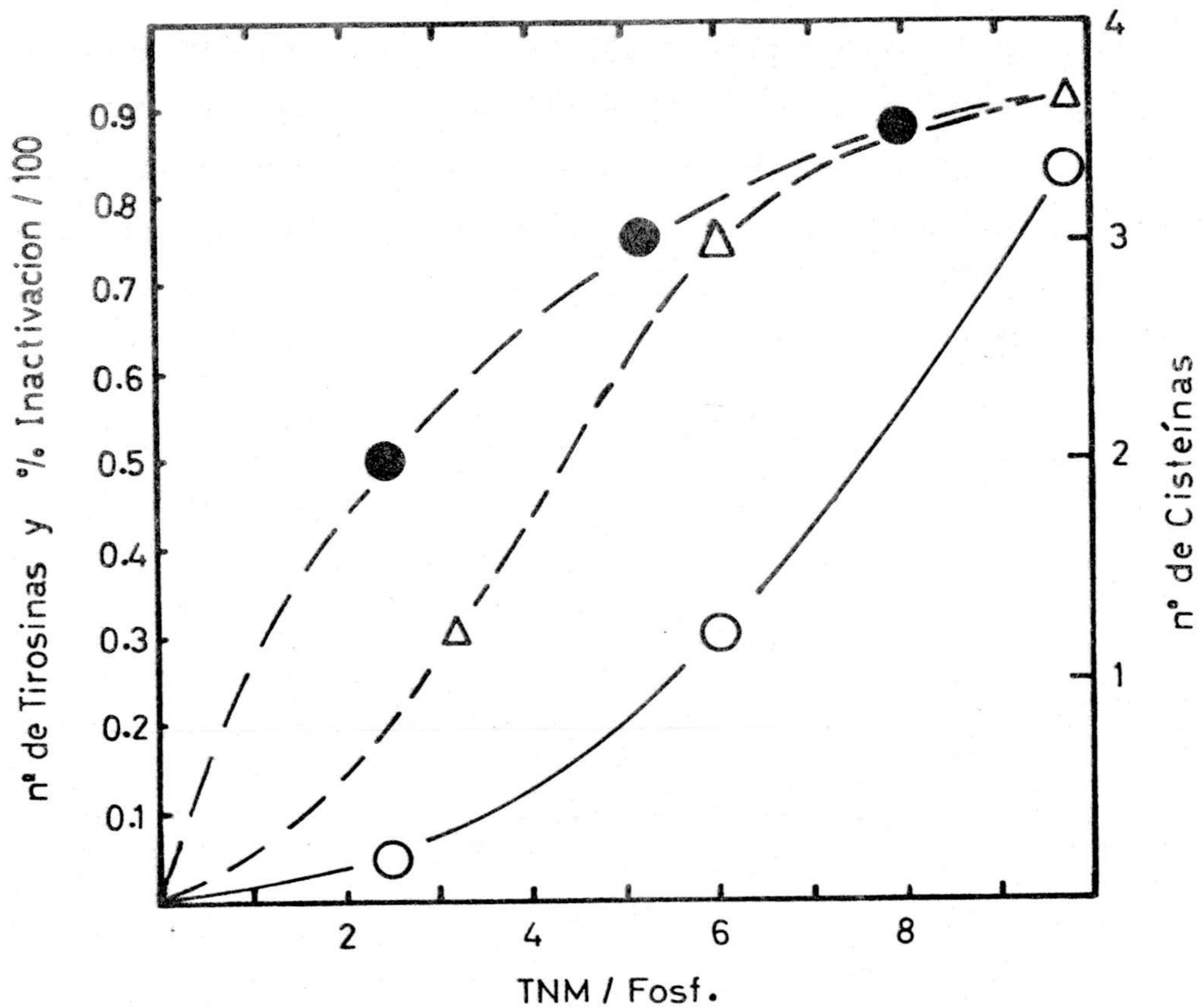


Fig. 40. Inactivación y modificación de tirosinas y cisteínas, por monómero de enzima, en función de la relación molar TNM/F.

inactivación: ● — ● — ● — — —

tirosinas: ○ — ○ — ○ — — —

cisteínas: △ — △ — △ — — —

ma junto con las obtenidas en la determinación de los grupos o-nitrotirosina y cisteína que habían sido modificados. Como se puede observar, la inactivación de la enzima se debe principalmente a la modificación de los grupos -SH de la fosforilasa, y unicamente cuando la pérdida de actividad era superior a un 70%, comenzaba a ser significativa la modificación de tirosinas.

5. Influencia del AMP sobre el número de tirosinas y cisteínas modificadas. Para dilucidar si el AMP protegía a la enzima de la modificación de los grupos -SH, o bien, de la nitración de los residuos de tirosina, se llevó a cabo la reacción de TNM con fosforilasa en presencia de AMP en las mismas condiciones en que se realizó la determinación de tirosinas y cisteínas. Los resultados están resumidos en la tabla XI.

TABLA XI

Efecto del AMP sobre el número de tirosinas y cisteínas modificadas por tratamiento con TNM.

relación molar TNM/F	AMP(mM)	-SH modificados	tirosinas modificadas
9,7 ± 0,2	2	3 ± 0,2	0,5 ± 0,2
9,7 ± 0,2	0,0	4 ± 0,2	0,8 ± 0,2

fosforilasa, $6,3 \cdot 10^{-5}$ M. en tris-Cl⁻, 0,05 M., EDTA 2 mM, pH7 tiempo de reacción, incubación con ME y eliminación de exceso de reactivo y productos de reacción, tal y como se ha descrito anteriormente.

La presencia de AMP, protege a un grupo -SH y solo parcialmente a la tirosina. Esto podría suponer que en el sitio de unión del AMP a la enzima se encuentran implicados ambos residuos aminoácidos, o bien, que existe una cierta interrelación entre ellos. Dejamos para el capítulo de DISCUSION el comentario a este respecto.

6. Fijación de AMP por la enzima modificada. Si el AMP protegía a la enzima de la pérdida de actividad y de la modificación de una cisteína, podría ocurrir que esta enzima tratada con TNM tuviese una capacidad de fijación de AMP inferior a aquella de la enzima nativa. En este sentido, se realizó una estimación cualitativa* de esta capacidad de enlace usando la técnica de filtración con gel, que se describe en EXPERIMENTAL.

El experimento fue llevado a cabo a pH 7, después de dos horas de reacción de una muestra de fosforilasa con TNM y de cuatro horas de incubación con ME, la misma se pasaba por una columna de sephadex G-25. Coleccionadas las fracciones, se mezclaban, precipitándose la enzima con sulfato amónico. El precipitado se disolvía en un volumen mínimo de la disolución con que se había equilibrado la columna, introduciéndose así en la misma. Esta columna, de sephadex G-25 (0,5 x 115 cm.) había sido preparada con un eluyente compuesto de glicerofosfato 0,05 M.; EDTA, 2 mM.; ME, 1,0 mM. y AMP, 0,1 mM.; y fue

* Al no disponer de la técnica habitual en la determinación de la constante de equilibrio de este efector, que es la diálisis en el equilibrio con AMP marcado, se utilizó la filtración con gel. Esta técnica, además de muy laboriosa en la determinación de constantes de equilibrio, que por otra parte, ya están medidas en el caso del AMP, está sometida a una gran cantidad de errores, por lo que nos limitamos a hacer una estimación cualitativa de la fijación de AMP.

ajustada su velocidad de elución a 20 ml/h. Paralelamente a la preparación de esta muestra, se realizó un control que fue sometido al mismo tratamiento salvo la reacción con TNM. Como se puede apreciar en la figura 41, el seno que aparece a continuación de la enzima tratada con TNM, y cuya área corresponde a la cantidad total de AMP enlazado por la misma, ($2,8 \cdot 10^{-8}$ moles), es menor que aquel que aparece en la elución de enzima no tratada, ($6,6 \cdot 10^{-8}$ moles). Esto quiere decir que la capacidad de fijación de AMP de la enzima, **disminuye** al ser tratada con TNM.

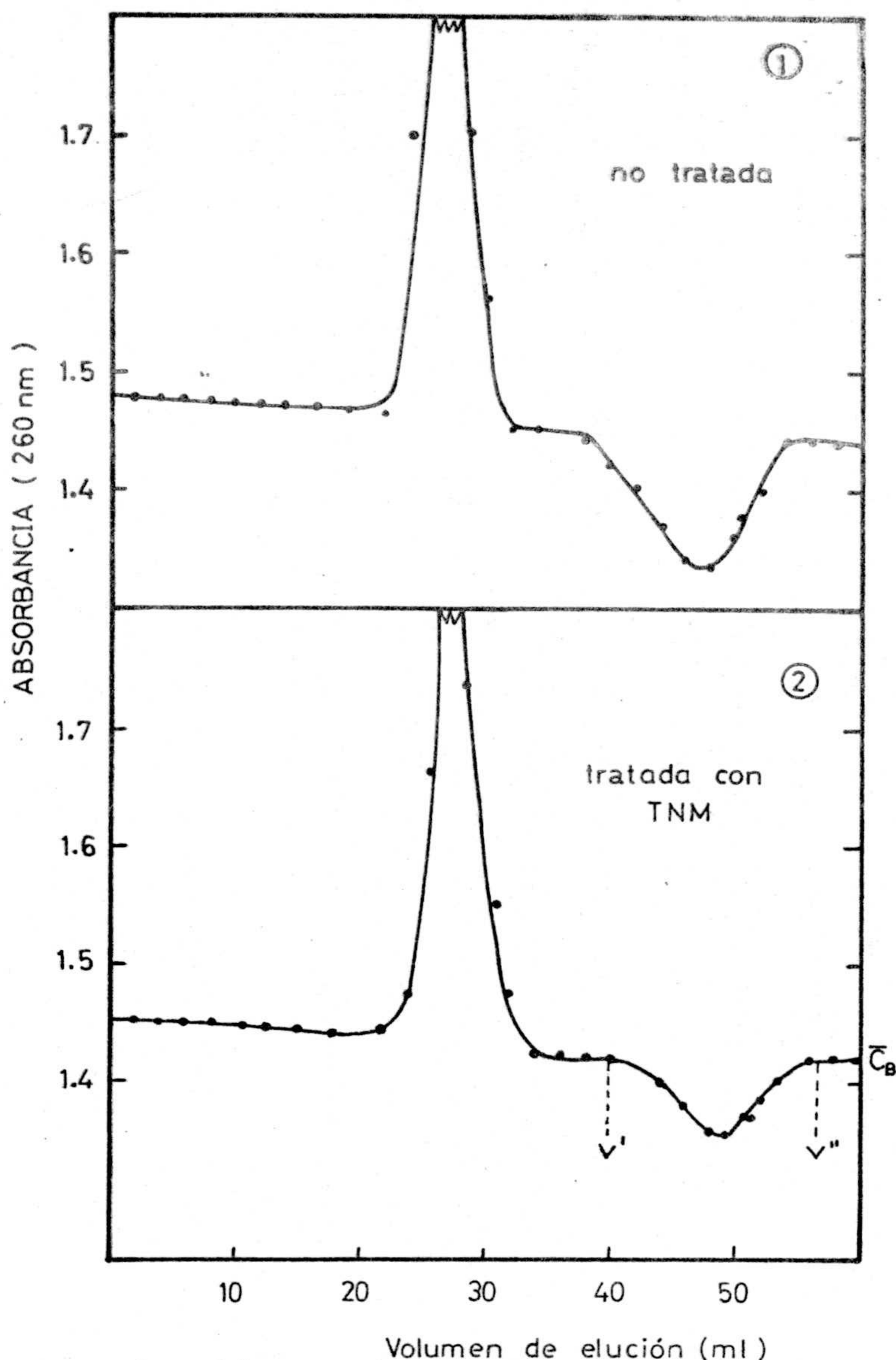


Fig. 41. Estimación cualitativa de fijación de AMP por fosforilasa.

absorbancia vs. volumen de elución.

La columna era equilibrada con una disolución compuesta por glicerofosfato, 0,05 M., EDTA 2 mM., ME, 1 mM. y AMP, 0,1 mM. a pH 7

(1) enzima no tratada con TNM, concentración antes de pasar por la columna: $8 \cdot 10^{-5}$ M.

(2) enzima tratada con TNM, concentración antes de pasar por la columna: $7,8 \cdot 10^{-5}$ M., relación molar TNM/F = 10.

7. Cinética de la reacción con TNM. Un estudio muy interesante de realizar es la cinética de reacción con TNM y su comparación con la cinética de pérdida de actividad. La banda a 428 nm, correspondiente a o-nitrotirosina es muy pequeña y se ve afectada por la gran banda de los nitroformatos centrada sobre 350 nm., por lo que no se puede utilizar para este tipo de estudio. Por ello se pensó en seguir la cinética mediante la aparición de iones nitroformiato, aunque había evidencia en la bibliografía de que en algunos casos la propia proteína catalizaba la descomposición del TNM(56).

En la figura 42 se representan los resultados de una cinética de valoración con TNM. En ella se observa una variación muy rápida que podría asignarse a la valoración de una cisteína (pep. nº1 o nº 2), seguida por otra lenta que a las dos horas prácticamente ha finalizado. A partir del coeficiente de extinción a la longitud de onda usada, se calculó que se formaban dos moles de ion nitroformiato por mol de fosforilasa en esta cinética lenta.

En la figura 43 se observa que los puntos experimentales se ajustan a una cinética de pseudo primer orden con una constante de velocidad $K = 20,5 \text{ M}^{-1} \text{ min.}^{-1}$

En el capítulo de DISCUSION se comentarán estos resultados junto con la cinética de inactivación.

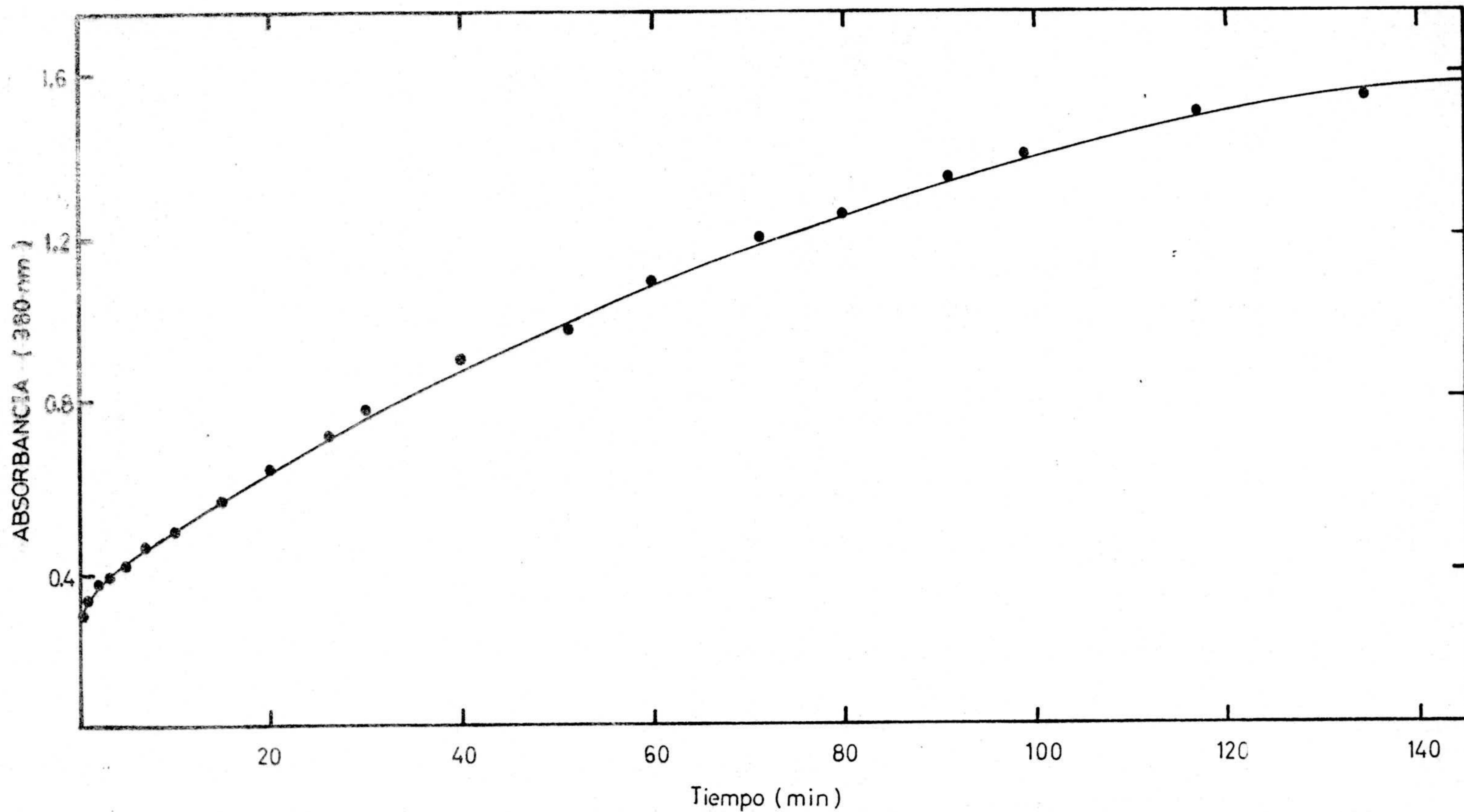


Fig. 42. Cinética de la reacción de fosforilasa con TNM.
fosforilasa, $8,3 \cdot 10^{-5}$ M. en glicerofosfato 0,05 M.,
EDTA 1 mM., pH 7
relación molar TNM/F = 10

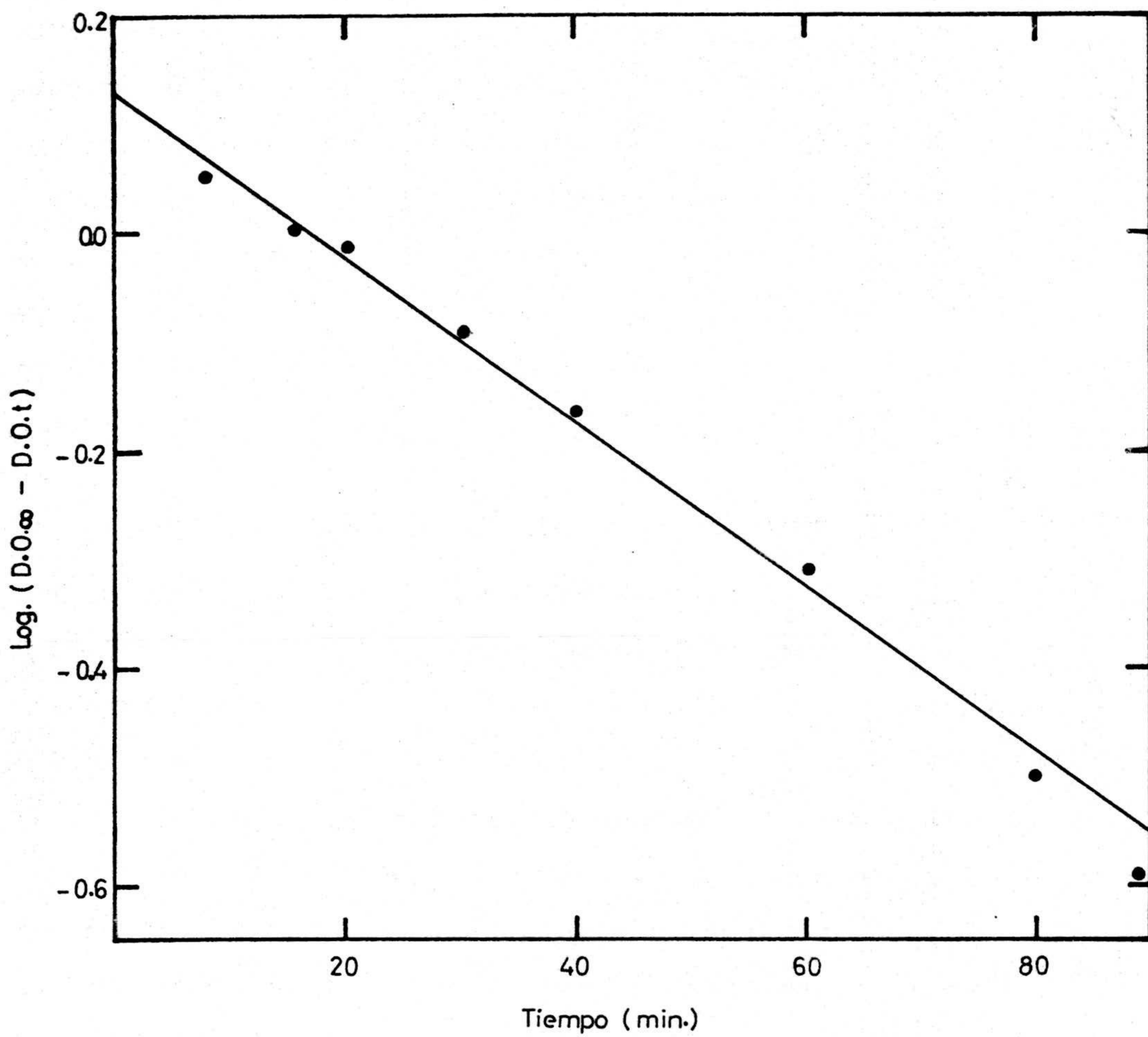


Fig. 43. Ajuste de los datos cinéticos de la fig. 42.

8. Cinética de la reacción con DTNB. La cinética de valoración de grupos -SH fue seguida también mediante el uso de DTNB. Aunque en la bibliografía (40,41) hay resultados en este sentido, se llevó a cabo con objeto de poder establecer una comparación con nuestros propios resultados. Como se puede observar en la figura 44, utilizando concentraciones de fosforilasa del orden de las utilizadas en la cinética de la reacción con TNM ($7,9 \cdot 10^{-5} M.$) y concentraciones de DTNB del orden de 1,1 mM, se obtiene una sola cinética ajustable a una reacción de pseudo primer orden ($K = 41 \text{ min}^{-1} M^{-1}$).

Puesto que hay evidencias en la bibliografía (41) de que las dos cisteínas lentas se pueden distinguir cinéticamente, se repitieron experimentos utilizando concentraciones de fosforilasa inferiores, así como concentraciones más elevadas de DTNB. En este caso (fig.45) las dos cisteínas de los péptidos nº 3 y nº 4, se pueden distinguir cinéticamente.

Utilizando concentraciones de fosforilasa del orden de $1 \cdot 10^{-5} M.$ y concentraciones de DTNB 1,0 mM, el resultado era la obtención de una sola cinética comparable a aquella de la figura 44. Esto quiere decir que es necesaria una elevada concentración de DTNB para conseguir distinguir cinéticamente las dos cisteínas lentas. Esta puede ser la explicación de que en la reacción con TNM, no podamos distinguir ambas cisteínas. En este caso se utiliza una concentración de TNM pequeña para situarnos en las mismas condiciones en que se ha producido la inactivación de la enzima.

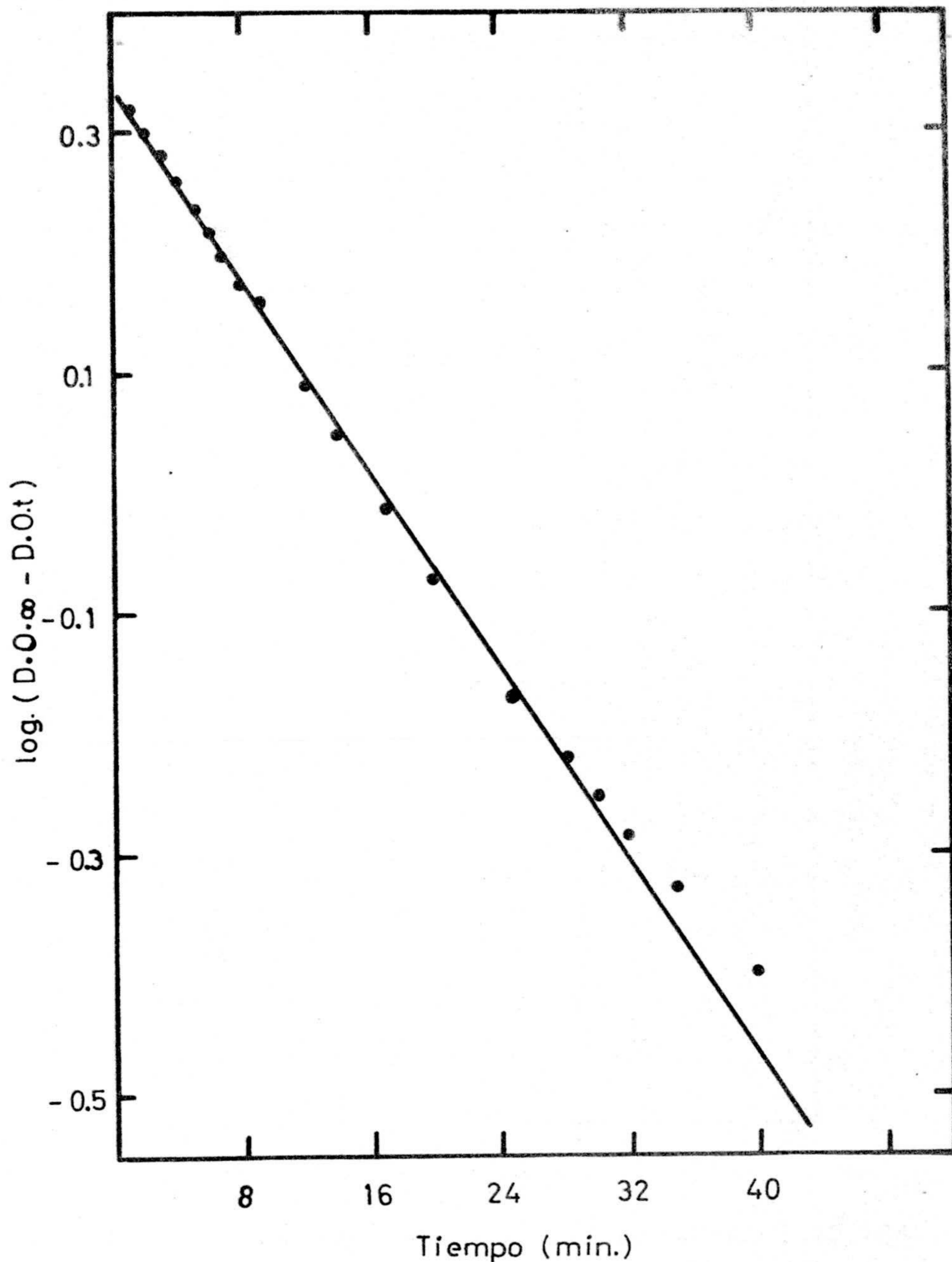


Fig. 44. Cinética de la reacción de cisteínas con DTNB fosforilasa, $7,9 \cdot 10^{-5}$ M. en glicerofosfato 0,05 M. y EDTA 2mM. pH neutro. DTNB, $1,1 \cdot 10^{-3}$ M. los resultados fueron ajustados como se indica en EXPERIMENTAL.

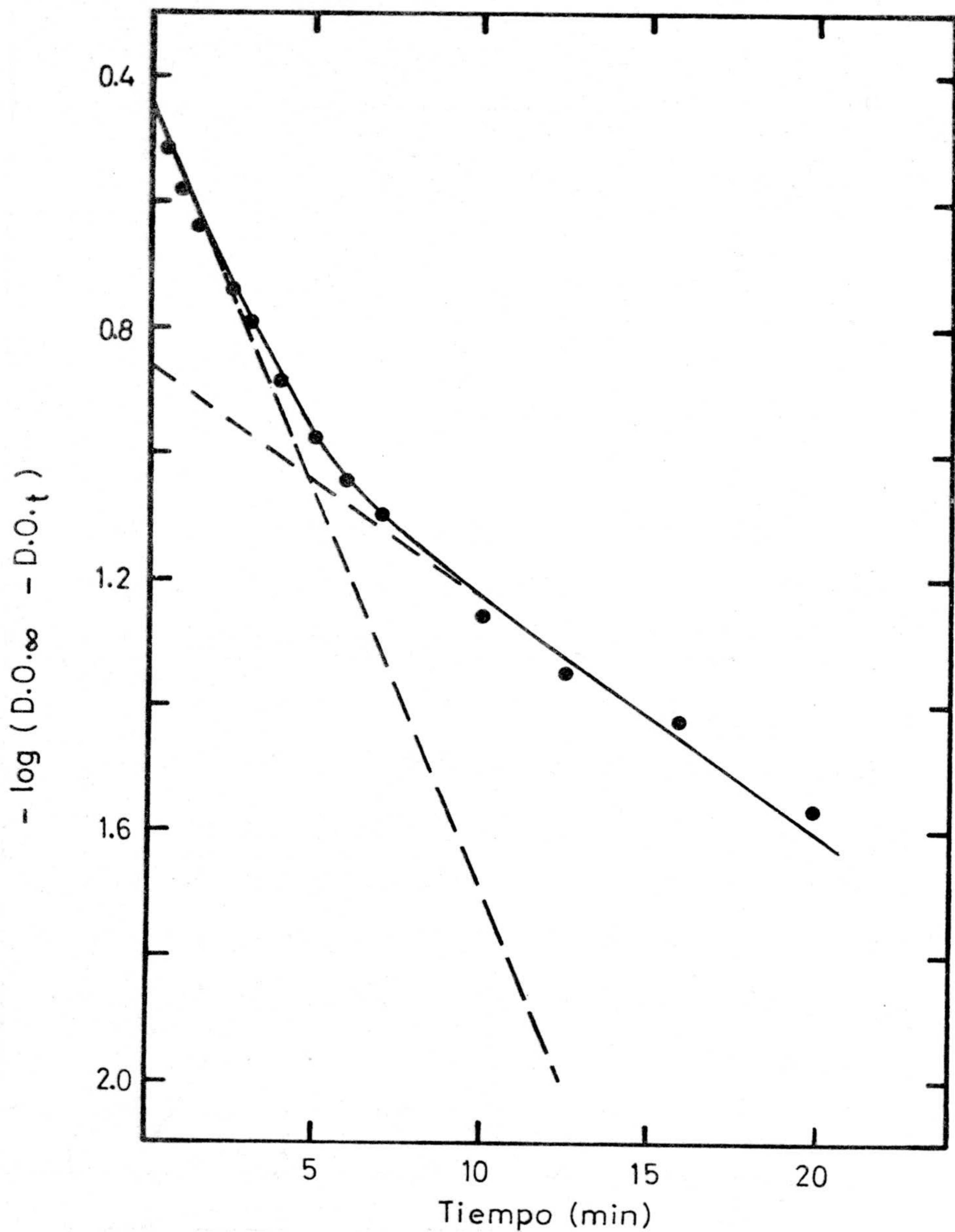


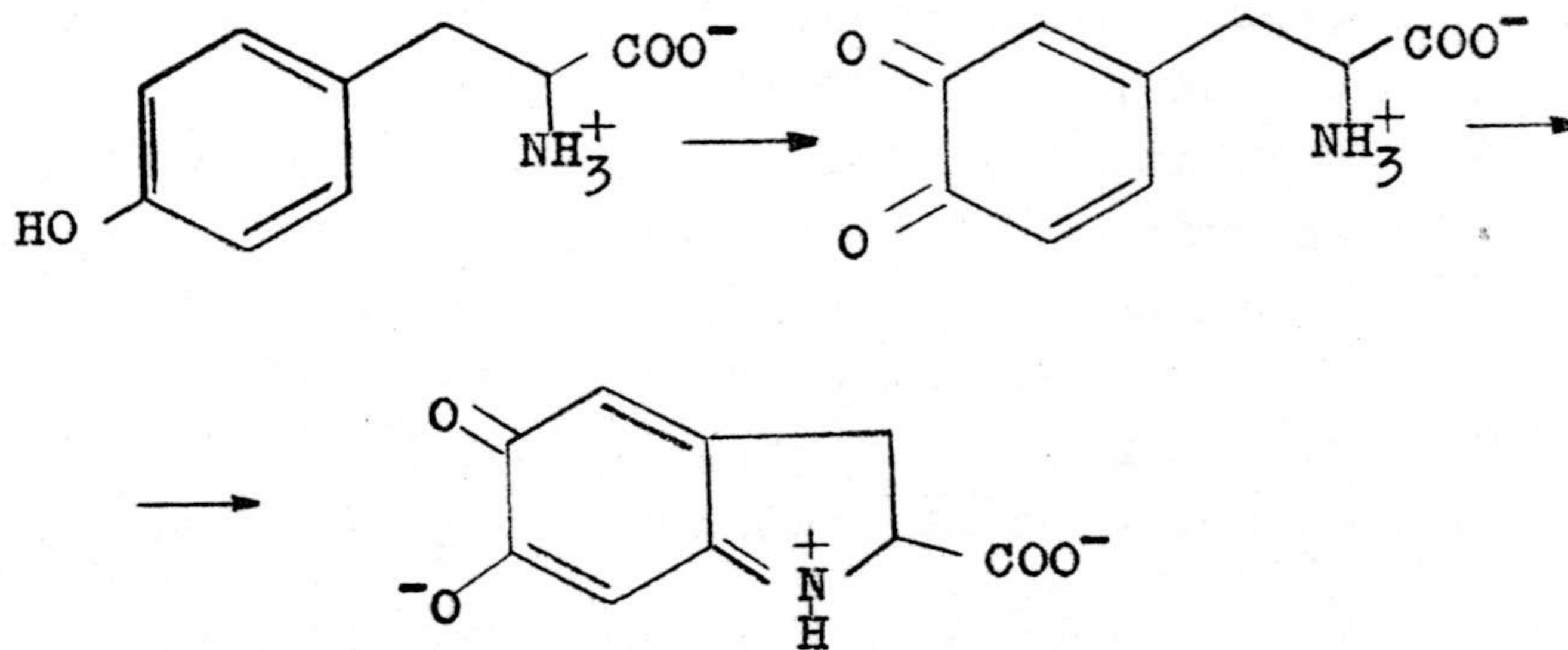
Fig. 45. Cinética de la reacción de cisteínas con DTNB.
 fosforilasa, $1,42 \cdot 10^{-5}$ M. en glicerofosfato 0,05 M.
 EDTA, 2 mM., pH neutro
 DTNB, 9 mM.
 los resultados fueron ajustados como se indica en
 experimental.

C) MODIFICACION QUIMICA
MEDIANTE EL USO DE SAL DE FREMY

En primer lugar vamos a exponer los resultados del tratamiento de tirosina, mercaptoetanol, cisteína y PLP con la sal de Fremy con objeto de tener una información previa sobre la reaccionabilidad de estas sustancias.

1. Reacción de sal de Fremy con tirosina. La reacción se llevaba a cabo añadiendo a una disolución de tirosina, una de sal de Fremy de forma que la relación molar sal de Fremy/tirosina era igual a 10.

A las dos horas de iniciada la reacción los cambios espectrales se habían completado. El espectro al cabo de esas dos horas, presentaba dos bandas de absorción con máximos a 300 nm. y 450 nm. (fig. 46). Este resultado está de acuerdo con los encontrados en la bibliografía (66), correspondiendo dichas bandas al producto 2-carboxi-5,6-dihidroxi indol (dopacromo) (I), formado como consecuencia de una ciclación intramolecular por medio de una reacción de adición.



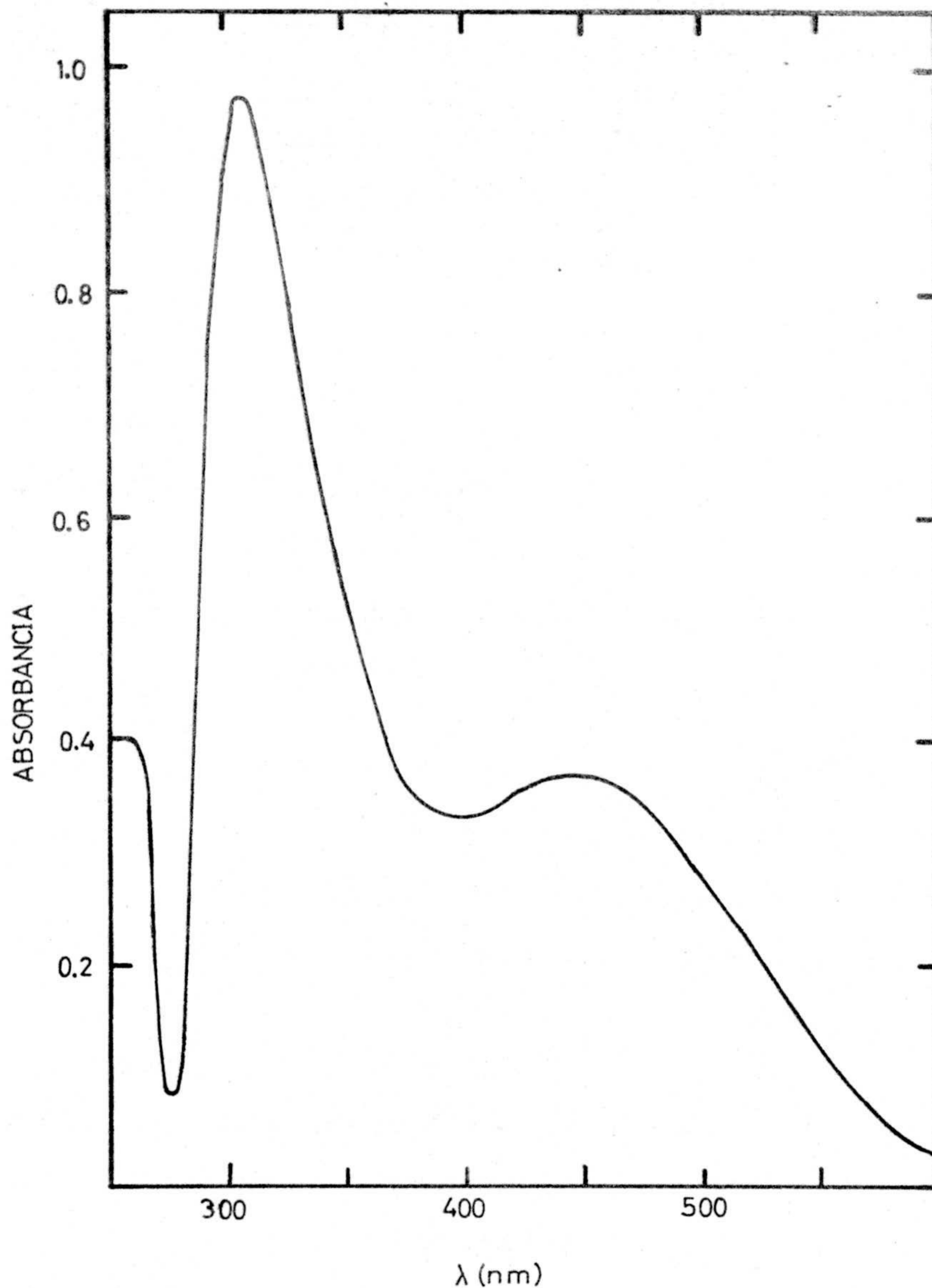


Fig. 46. Espectro del producto de reacción de tirosina con sal de Fremy
 tirosina, $4,4 \cdot 10^{-4}$ M.; sal de Fremy, $4,6 \cdot 10^{-3}$ M.
 en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA 1 mM. pH 7,5
 en la cubeta de referencia se añadió sal de Fremy
 de forma que la concentración de este producto
 era la misma en ambas cubetas.
 el espectro se registró a las dos horas de iniciada
 la reacción

2. Reacción con mercaptoetanol y cisteína. La reacción se llevó a cabo con ambos productos añadiendo la cantidad de sal de Fremy necesaria para que la relación molar sal de Fremy/tiol no fuera superior a diez. La concentración del tiol en los experimentos que se realizaron oscilaba entre 10^{-4} y 10^{-5} M.

Después de 24 horas de iniciada la reacción, no se encontró la aparición de ninguna nueva banda de absorción en las regiones de visible y ultravioleta.

Este resultado nos ponía en conocimiento de que ningún producto, que poseyera un cromóforo capaz de absorber en las regiones del espectro desde 260 nm. a 600 nm., se formaba en la reacción de sal de Fremy con tioles de bajo peso molecular.

3. Reacción de sal de Fremy con PLP. Después de iniciada la reacción de sal de Fremy con una disolución de PLP no se observó ningún cambio en las características espectrales del cofactor. No obstante este resultado, se realizó un experimento para asegurarnos de que el PLP no era afectado cuando se añadía sal de Fremy a la enzima.

A una disolución de fosforilasa se añadió la sal de Fremy necesaria para que la relación molar sal de Fremy/fosforilasa, (SF/F), fuera igual a 12. A las dos horas de haber añadido el reactivo, la disolución se desproteinizó, y el contenido en PLP se determinó como se describe en EXPERIMENTAL. Las características espectrales del sobrenadante eran las de PLP libre, en medio acuoso, y la cantidad correspondía con la que se encontraba en la enzima nativa. (fig.47).

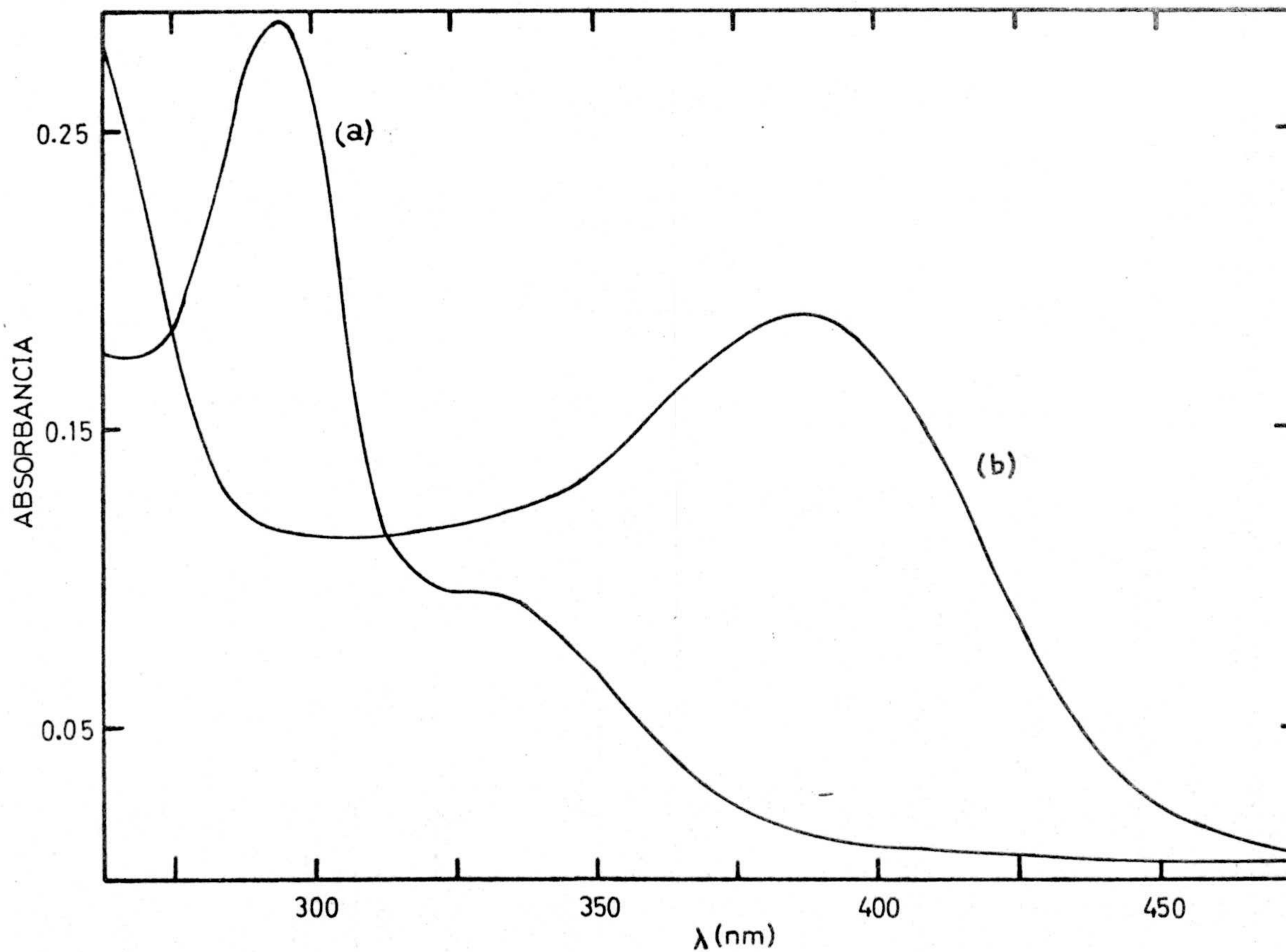


Fig. 47. Espectro de PLP liberado por desproteínización de una muestra de fosforilasa tratada con sal de Fremy
(a) medio ácido
(b) " básico

4. Inactivación de la enzima por tratamiento con sal de Fremy. La reacción fue realizada, en principio, utilizando - cantidades de sal de Fremy y tiempos de reacción muy grandes. En las tablas XII y XIII están resumidos los resultados obtenidos en estas condiciones.

TABLA XII

Inactivación de fosforilasa por tratamiento con sal de Fremy, en función del tiempo.

t (min)	actividad (%)
5	10
10	5
20	0,0
30	0,0

fosforilasa, $0,27 \cdot 10^{-5}$ M. relación molar $s_F/F = 104$

TABLA XIII

Inactivación de fosforilasa por sal de Fremy, en función de la concentración de este reactivo.

relación molar s_F/F	actividad (%)
0,0	100
26	2
52	0,0
104	0,0

fosforilasa, $0,27 \cdot 10^{-5}$ M. tiempo de reacción: 30 minutos.

En estas condiciones de alta concentración de reactivo,

se produce una total pérdida de actividad, incluso usando pe queños tiempos de reacción. Los resultados del tratamiento en condiciones más suaves están resumidos en las figuras 48 y 49. Utilizando relaciones molares sF/F no superiores a 10, la inactivación era completa a los 45 minutos. El periodo de semireacción se podía calcular, en cinco minutos.

La no reversibilidad de la reacción de inactivación, por - incubación con ME, fue comprobada en repetidas ocasiones aña diendo a la mezcla de reacción un exceso de este reactivo y permitiendo la incubación durante una hora a 30 °C. y 17 horas a temperatura ambiente. No se observaba recuperación d e la actividad después de este tratamiento.

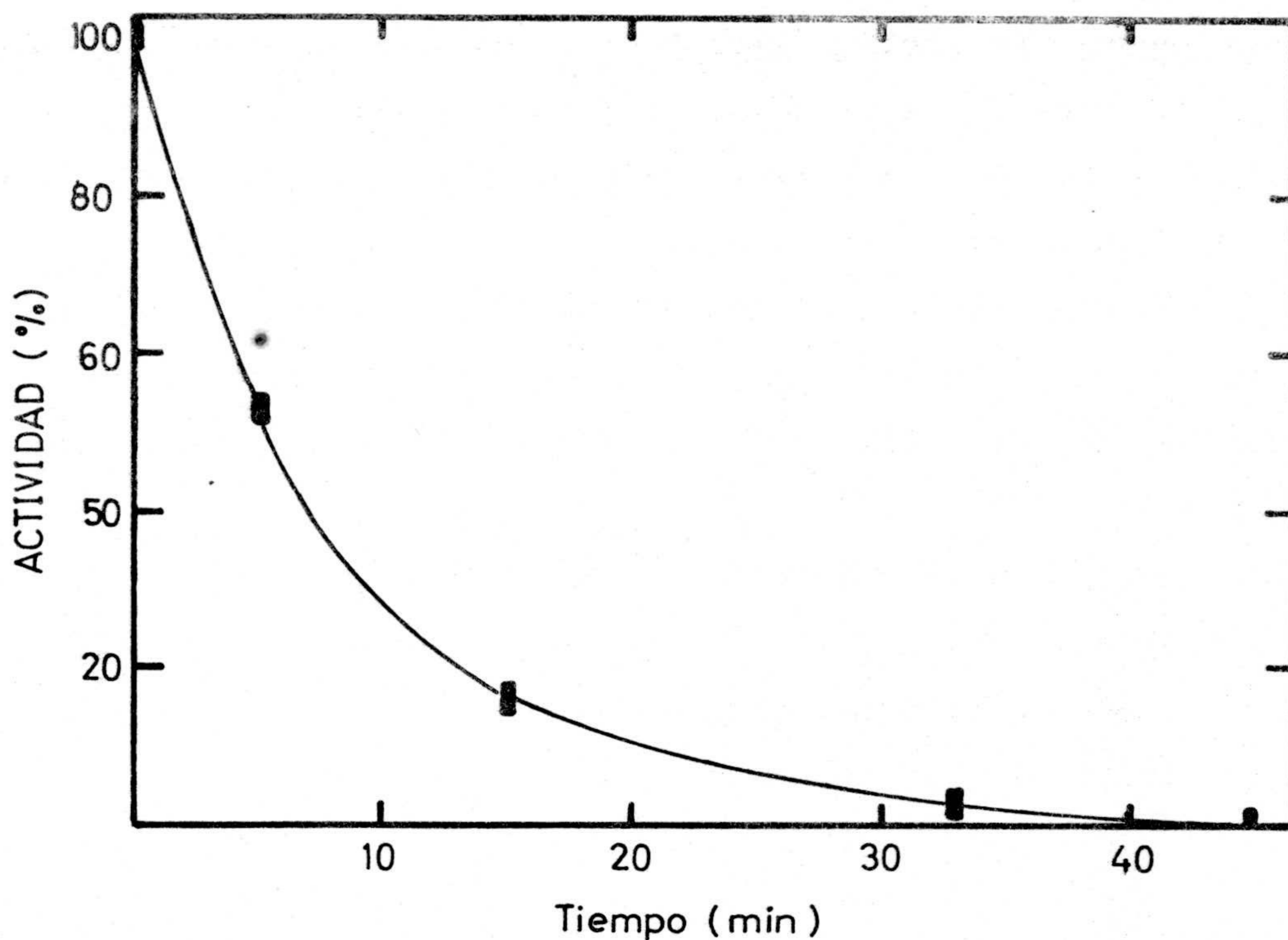


Fig 48. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con sal de Fremy.

% de actividad vs. tiempo de reacción
fosforilasa, $1,18 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA
1 mM. pH 7,5
relación molar sF/F = 9,3.

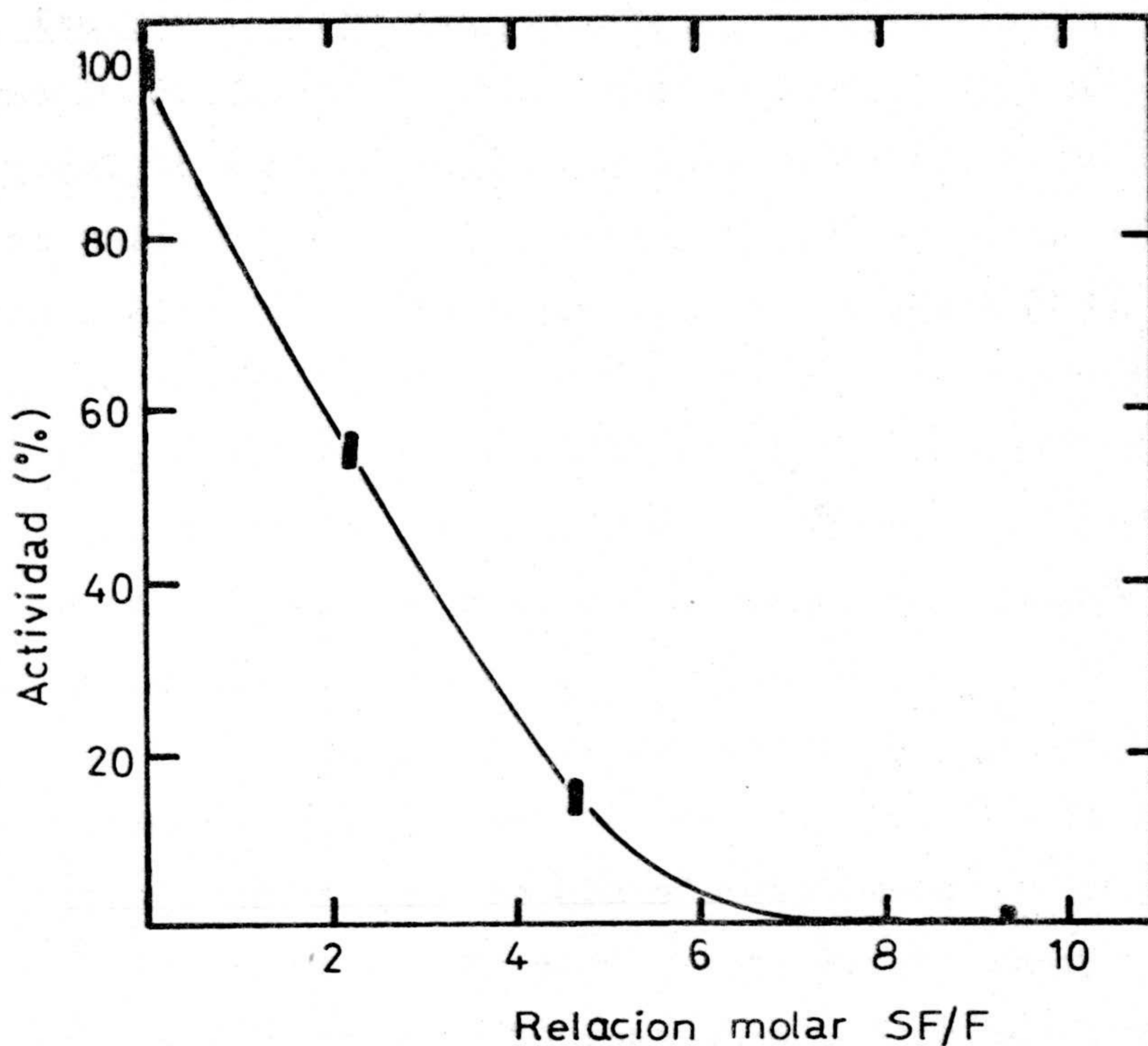


Fig. 49. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con sal de Fremy.

% de actividad vs. relación molar sF/F
 fosforilasa, $1,18 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA
 1 mM. pH 7,5.

tiempo de reacción: 45 minutos.

5. Espectroscopía de fosforilasa tratada con sal de Fremy. En las mismas condiciones en que se realizó el experimento de inactivación de fosforilasa por sal de Fremy, esto es, concentración de fosforilasa 1,0 - 1,5 mg/ml y relación molar $sF/F = 10$, se realizó espectroscopía de la enzima tratada por dicho reactivo, a los cuarenta minutos de iniciada la reacción. En la figura 50 se da un espectro a título de ejemplo; como se puede observar, aparece una banda con máximo a 500 nm., un hombro a 380 nm y una tercera banda con un máximo a 310 - 320 nm., difícil de determinar dada la fuerte absorción que en esta región presenta el PLP en la enzima. Dichas bandas permanecían después de pasar la mezcla de reacción por sephadex G-25. Cuando se utilizaban cantidades de sal de Fremy superiores, y relación molar $sF/F = 45,5$, el espectro obtenido era el mismo, (fig. 50), manteniéndose la misma relación entre los máximos a 380 nm y 500 nm.

Este resultado está de acuerdo con el encontrado en la bibliografía (66) donde, en el estudio de la oxidación con sal de Fremy de péptidos conteniendo tirosina con el grupo NH_2 bloqueado, aparecen las mismas bandas de absorción que las encontradas por nosotros en la oxidación de fosforilasa, aunque con intensidades relativas en los máximos diferente.

Estos mismos autores (66) asignan la banda que aparece con un máximo a 380 nm al producto de oxidación de una tirosina situada en un péptido de forma que al tener bloqueado el grupo NH_2 no puede dar lugar a la ciclación intramolecular que se produce en la oxidación de tirosina que hemos vis

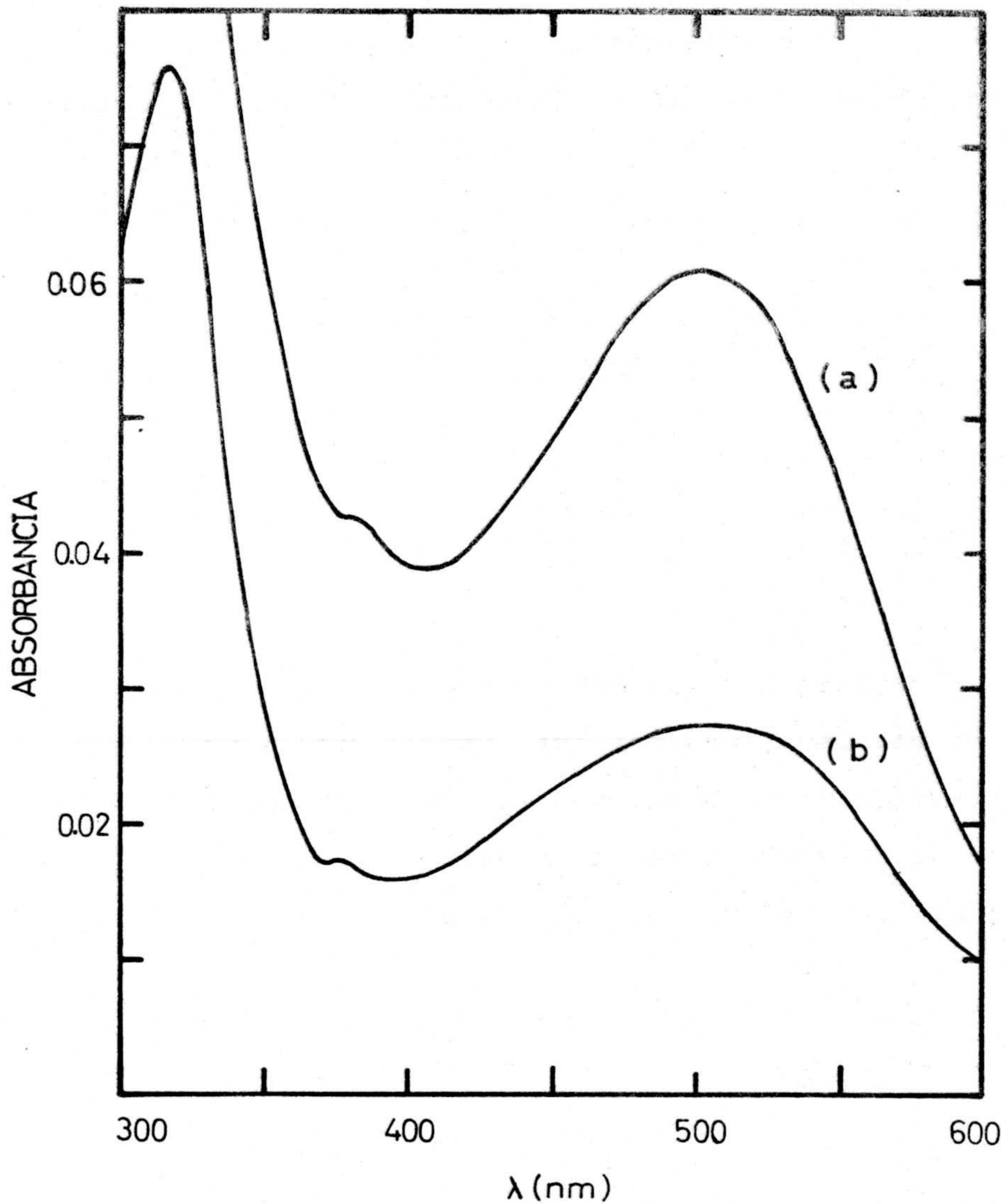
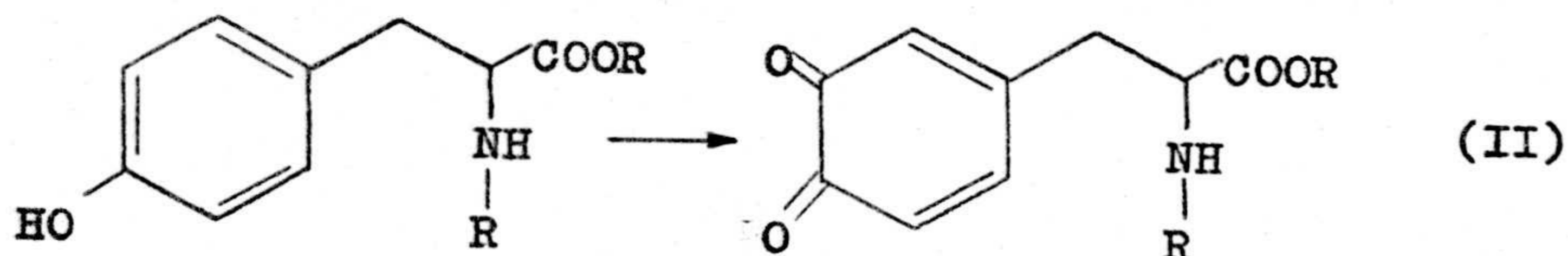


Fig. 50. Espectro de fosforilasa tratada con sal de Fremy.
 (a) fosforilasa, $1,56 \cdot 10^{-5}$ M. sF/F = 45,5; tiempo de reacción: 90 min.
 (b) fosforilasa, $1,31 \cdot 10^{-5}$ M. sF/F = 10; tiempo de reacción: 90 min.

to anteriormente. Siguiendo a estos autores, este producto de oxidación sería la o-benzoquinona (II) ("Dopaquinona"):



En cuanto a las bandas que aparecen a 500 nm y 310-320 nm, no discutidas por los citados autores y no habiéndose en contrado en la bibliografía ninguna referencia a las mismas, serán discutidas más adelante en el capítulo de DISCUSION - junto con los resultados que a continuación se expondrán.

6. Determinación del número de tirosinas modificadas mediante el uso de espectroscopía diferencial. El número de tirosinas modificadas por monómero de fosforilasa fue evaluado utilizando el método descrito por Edelhoeh, (90). En la figura 51 se da el espectro de diferencias calculado por sustracción del espectro de fosforilasa nativa, el de la enzima marcada con sal de Fremy de forma que la relación molar sF/F era igual a 45,5. De esta forma, el incremento de densidad óptica a 275 nm. corresponde a 4,2 tirosinas menos en fosforilasa tratada que en fosforilasa nativa, utilizando un coeficiente de extinción molar a 275 nm. de 1.500 para la tirosina en la enzima (90).

Utilizando este resultado, se podría evaluar un coeficiente de extinción molar para los máximos de absorción del cromóforo correspondiente a la oxidación de la tirosina en la enzima. A partir de la absorción que presenta la enzima marcada en el mismo experimento en que se hizo la anterior evaluación del número de tirosinas, se obtiene un $\epsilon_M = 700$ a 380 nm y un $\epsilon_M = 1100$ a 500 nm.

Cuando la enzima se desnaturaliza con guanidina 3,5M, es de esperar que con un gran exceso de sal de Fremy puedan oxidarse todas las tirosinas presentes en fosforilasa (10) que son 34. En estas condiciones casi desaparecía la banda de 500 nm, hecho que comentaremos en la DISCUSION. Por eso utilizamos el coeficiente de extinción calculado a 380 nm para evaluar el número de tirosinas modificadas, que resultó ser de 35 por lo que aceptamos el coeficiente calculado.

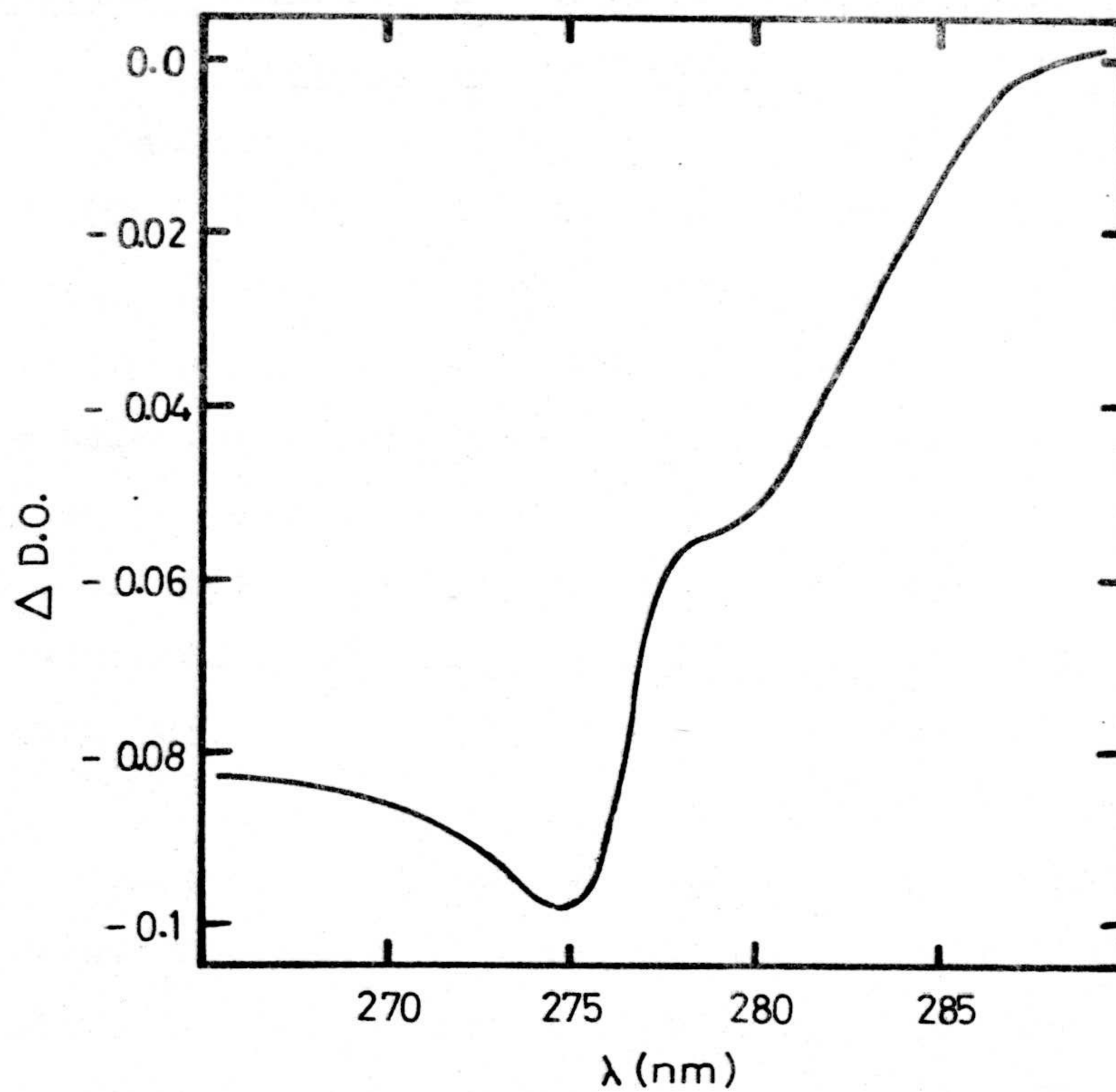


Fig. 51. Espectro de diferencias, fosforilasa tratada con sal de Fremy vs. fosforilasa nativa. fosforilasa, $1,56 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05M. EDTA, 1 mM., pH 7,5
Relación molar sF/F = 45,5

Por otra parte, este coeficiente de extinción está de acuerdo con la absorbancia que presentan péptidos que contienen tirosina con el grupo NH_2 bloqueado (66).

A continuación, procedimos a realizar un experimento para determinar el número máximo de tirosinas que podían ser modificadas sobre fosforilasa nativa, utilizando sal de Fremy. En este caso se utilizó una cantidad de reactivo tal que la relación molar sF/F era igual a 75. Después de 18 horas de haber iniciado la reacción se apreció que 18 tirosinas habían sido modificadas, utilizando el coeficiente de extinción que hemos evaluado.

Si tenemos en cuenta que con N-acetilimidazol (51) se pueden modificar 16 de los 34 residuos de tirosina que hay en la fosforilasa, este último resultado confirma de nuevo la validez del coeficiente de extinción que hemos calculado.

En la tabla XIV se compara el número de tirosinas valorables en la enzima tratada en presencia de guanidina con el número de tirosinas modificadas en fosforilasa nativa usando grandes tiempos y cantidades de sal de Fremy también muy grandes.

En la enzima nativa solo se puede valorar sobre el 50% del total de tirosinas presentes, resultado que podría indicar que la mitad del número total de tirosinas por monómero que se encuentran en la enzima se hallan ocluidas en el interior de la misma no siendo accesibles al reactivo utilizado.

TABLA XIV

Número de tirosinas modificadas con sal de Fremy en enzima nativa y desnaturalizada.

condiciones	nº tirosinas
con guanidina	35
sin guanidina	18

fosforilasa, $1,35 \cdot 10^{-5}$ M. relación molar sF/F = 75. tiempo de reacción 18 horas.

Utilizando el mismo coeficiente de extinción que hemos evaluado, se determinó el número de tirosinas que eran modificadas en las condiciones que eran las mínimas necesarias para producir la inactivación, y que están resumidas en la figura 49. En esas condiciones el número de tirosinas modificadas resultaba ser: 1,8 - 1,9 por monómero de fosforilasa.

Este resultado podría indicar que ambas tirosinas son importantes para mantener las propiedades catalíticas de la enzima. Sin embargo, más información respecto al papel desempeñado por estas tirosinas en las propiedades enzimáticas de la fosforilasa, las podemos obtener si se estudia el proceso de inactivación en presencia de AMP y en esas condiciones se determina el número de tirosinas modificadas.

7. Influencia del efector alostérico, AMP, sobre el tratamiento de la enzima con sal de Fremy. Estos experimentos se llevaban a cabo simultáneamente con los de inactivación de la enzima por tratamiento con sal de Fremy. A porciones de la disolución de fosforilasa utilizada se les añadía una cantidad de AMP de forma que la concentración final del efector era del orden de 1,0 mM. Después de unos minutos de incubación, se añadía sal de Fremy exactamente en las mismas cantidades que a las muestras que no habían sido incubadas previamente con AMP.

En la figura 52 están resumidos los resultados obtenidos junto con las condiciones experimentales. Como se puede observar, el AMP ejerce una protección sobre la enzima de forma que en las condiciones en que la misma es inactivada totalmente, cuando la fosforilasa es incubada con AMP previamente, el resultado es la obtención de una enzima con el 75% de la actividad original. Igualmente, como se puede observar de ambas curvas, la protección ejercida por el AMP es prácticamente total en las condiciones en que la enzima no protegida ha perdido el 50% de la actividad.

Con objeto de esclarecer si esta protección ejercida por el AMP tenía alguna relación con las tirosinas oxidadas simultáneamente a la desactivación, se realizaron los siguientes experimentos:

Dividida una disolución de fosforilasa en dos porciones, una de ellas era incubada con AMP, antes de añadir sal de Fremy en las mismas condiciones en que se hicieron los experimen

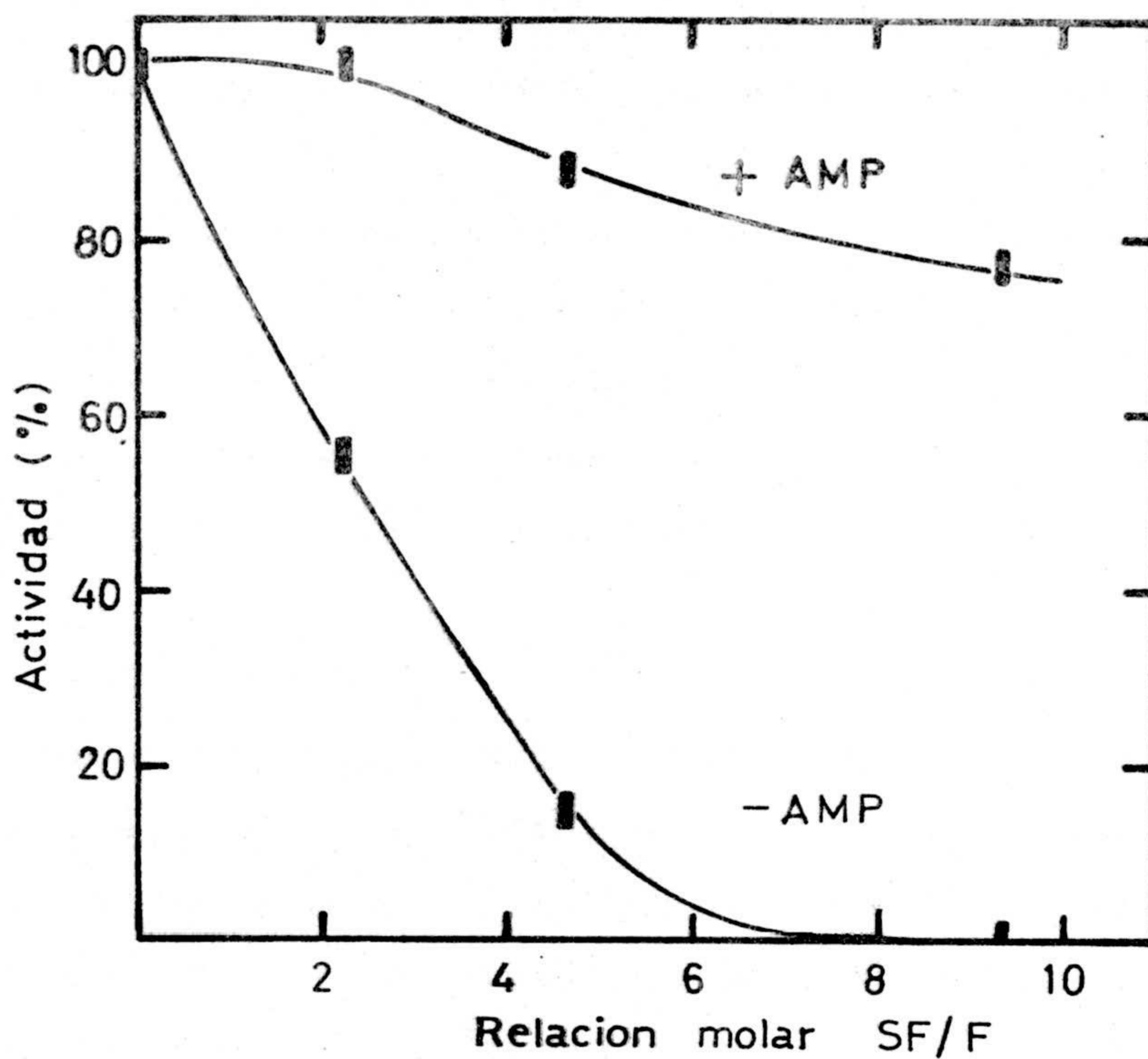


Fig. 52. Inactivación de fosforilasa por tratamiento con sal de Fremy.

% de actividad vs. relación molar sF/F
 fosforilasa, $1,18 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA
 1 mM. pH 7,5

tiempo de reacción: 45 minutos.

concentración de AMP cuando es añadido: 1 mM.

tos de inactivación. A continuación se estudiaron los cambios espectrales sufridos por ambas muestras (incubada y libre de AMP) después del tratamiento con sal de Fremy. Los resultados están resumidos en la tabla XV.

TABLA XV

Influencia del AMP sobre la inactivación, y oxidación de tirosinas, de la fosforilasa tratada con sal de Fremy

AMP (mM)	actividad (%) [*]	nº tirosinas modificadas ^{**}
0,0	0,0	1,8
1,0	75	0,4

* fosforilasa, $1,18 \cdot 10^{-5}$ M.

** fosforilasa, $1,31 \cdot 10^{-5}$ M.

relación molar sF/F en todos los casos = 10

el número de tirosinas modificadas fue calculado a partir de la absorbancia a 380 nm.

El % de actividad perdida en la enzima tratada con sal de Fremy en presencia de AMP (25%) es paralelo al % de tirosinas oxidadas respecto de las que lo son en ausencia del efector (22%). En la figura 53 se da el espectro de diferencias de fosforilasa tratada con sal de Fremy en ausencia de AMP vs. fosforilasa tratada con Fremy en presencia del efector. El AMP protege a la enzima de los cambios espectrales que surgen como consecuencia del tratamiento con sal de Fremy.

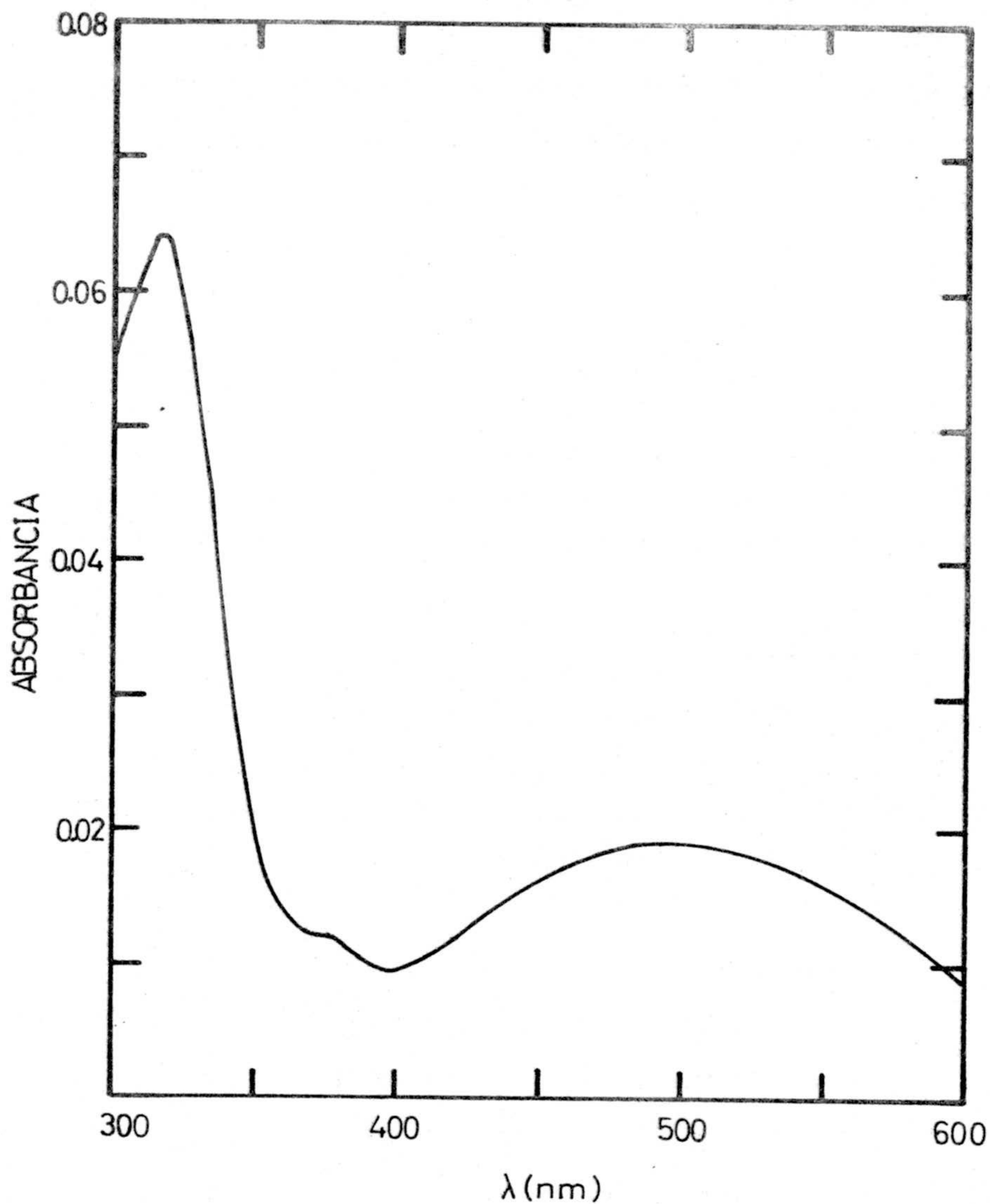


Fig. 53. Espectro de fosforilasa tratada con sal de Fremy vs. fosforilasa tratada con sal de Fremy en presencia de AMP.
 fosforilasa, $1,31 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M.
 EDTA, 1 mM., pH 7,5
 relación molar sF/F = 10
 AMP, 1 mM. en la muestra en que está añadido.

8. Cinética de la reacción de fosforilasa con sal de Fremy. Fue seguida midiendo el aumento de absorbancia a 500 nm (fig. 54). Como se puede apreciar en dicha figura, el periodo de semireacción coincide con el encontrado para la pérdida de actividad en función del tiempo (fig 48). Los resultados se pueden ajustar a una cinética de pseudo primer orden (fig. 55), con una constante de velocidad $K = 970 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Esta cinética correspondería a la de oxidación de las prácticamente dos tirosinas que son modificadas en estas condiciones. Cuando se aumenta la cantidad de sal de Fremy y el tiempo de reacción, la cinética que se obtiene (fig. 56), ya no presenta el mismo periodo de semireacción que el correspondiente a la inactivación. Cuando ajustamos los datos de dicha cinética a una de pseudo primer orden (figura 57), la misma se puede desdoblar en dos, una de ellas presenta una constante de velocidad $K = 610 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$., comparable a aquella de la figura 55 y correspondiente a la modificación de dos tirosinas aproximadamente , y la otra con una constante muy inferior $K = 22,5 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. correspondería a dos tirosinas adicionales que son menos reactivas y que no tendrían nada que ver con la inactivación de la enzima. Si se compara el tiempo al que empiezan a valorarse estas dos últimas tirosinas con los datos de la tabla XII se observará que coincide con la casi total pérdida de actividad. Esto sería una prueba de que únicamente dos tirosinas, como máximo , son importantes para mantener las propiedades catalíticas de la enzima.

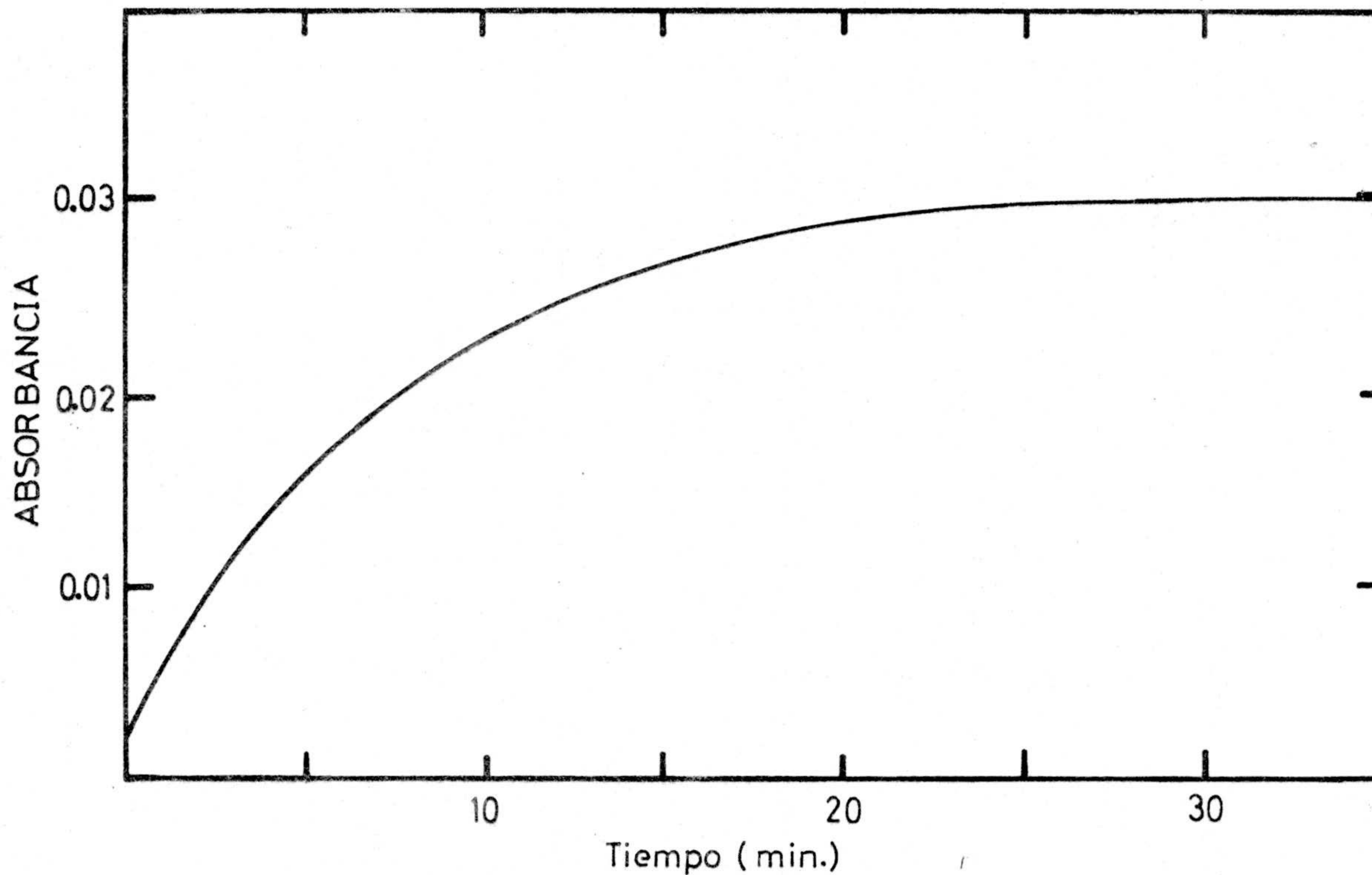


Fig. 54. Cinética de la reacción de sal de Fremy con fosforilasa, seguida midiendo el aumento de absorbancia a 500 nm.
fosforilasa, $1,31 \cdot 10^{-5}$ M en tris- Cl^- 0,05 M.,
EDTA, 1 mM., pH 7,5
relación molar sF/F = 10

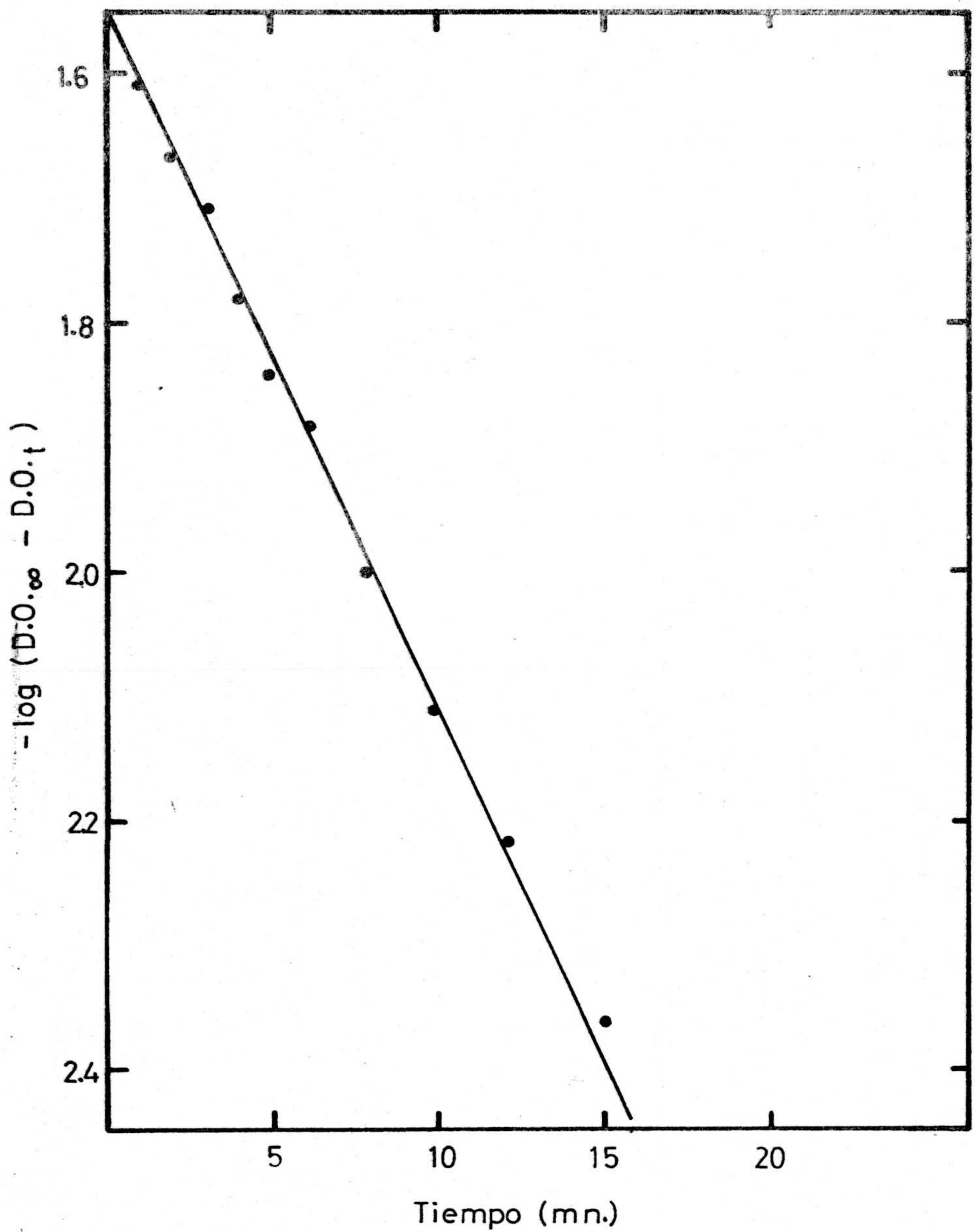


Fig. 55. Ajuste de los datos de la figura 54, según se indica en la parte EXPERIMENTAL.

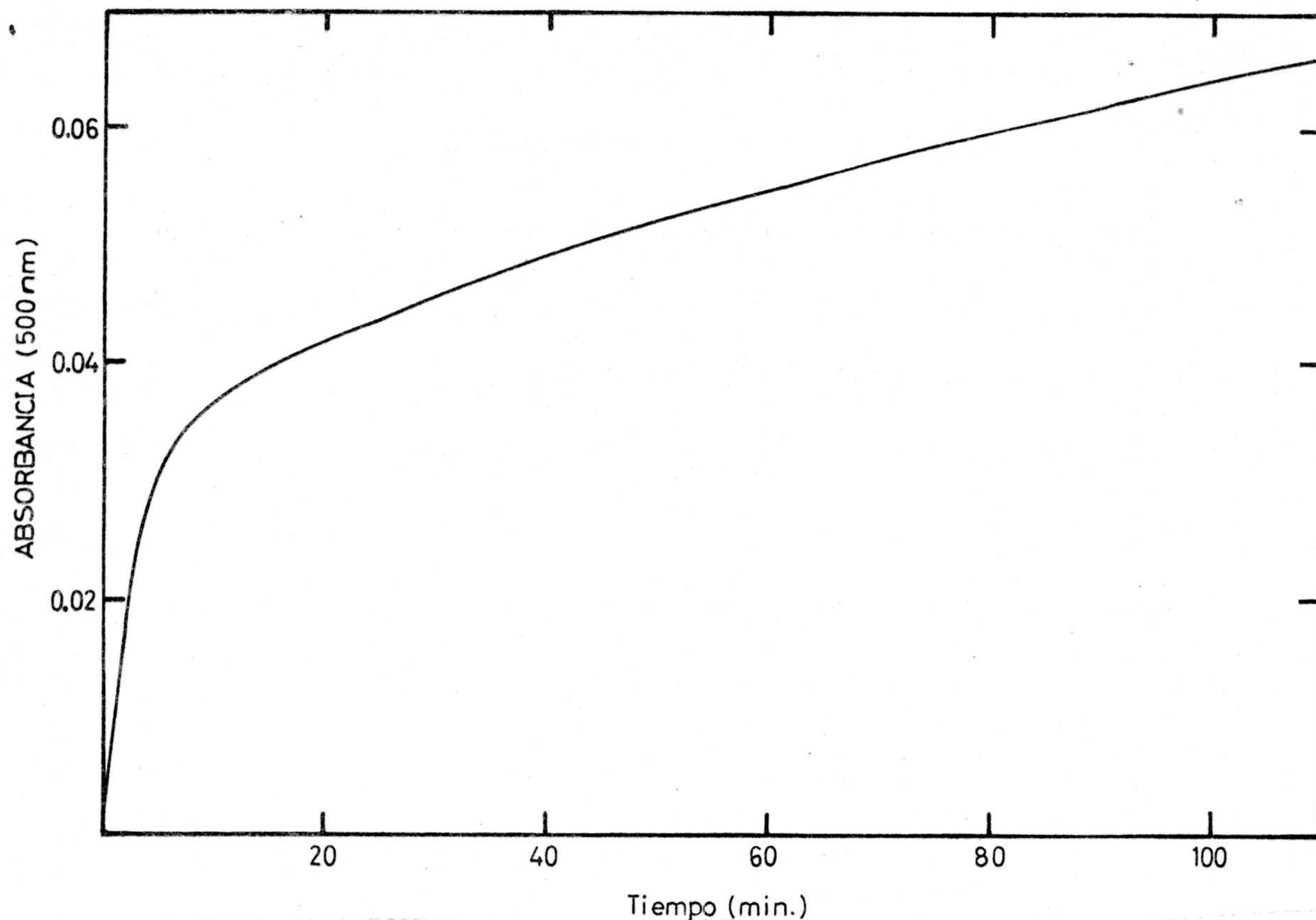


Fig. 56. Cinética de la reacción de sal de Fremy con fosforilasa, seguida midiendo el aumento de absorbancia a 500 nm.
fosforilasa, $1,56 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M.
EDTA, 1 mM., pH 7,5
relación molar sF/F = 45,5

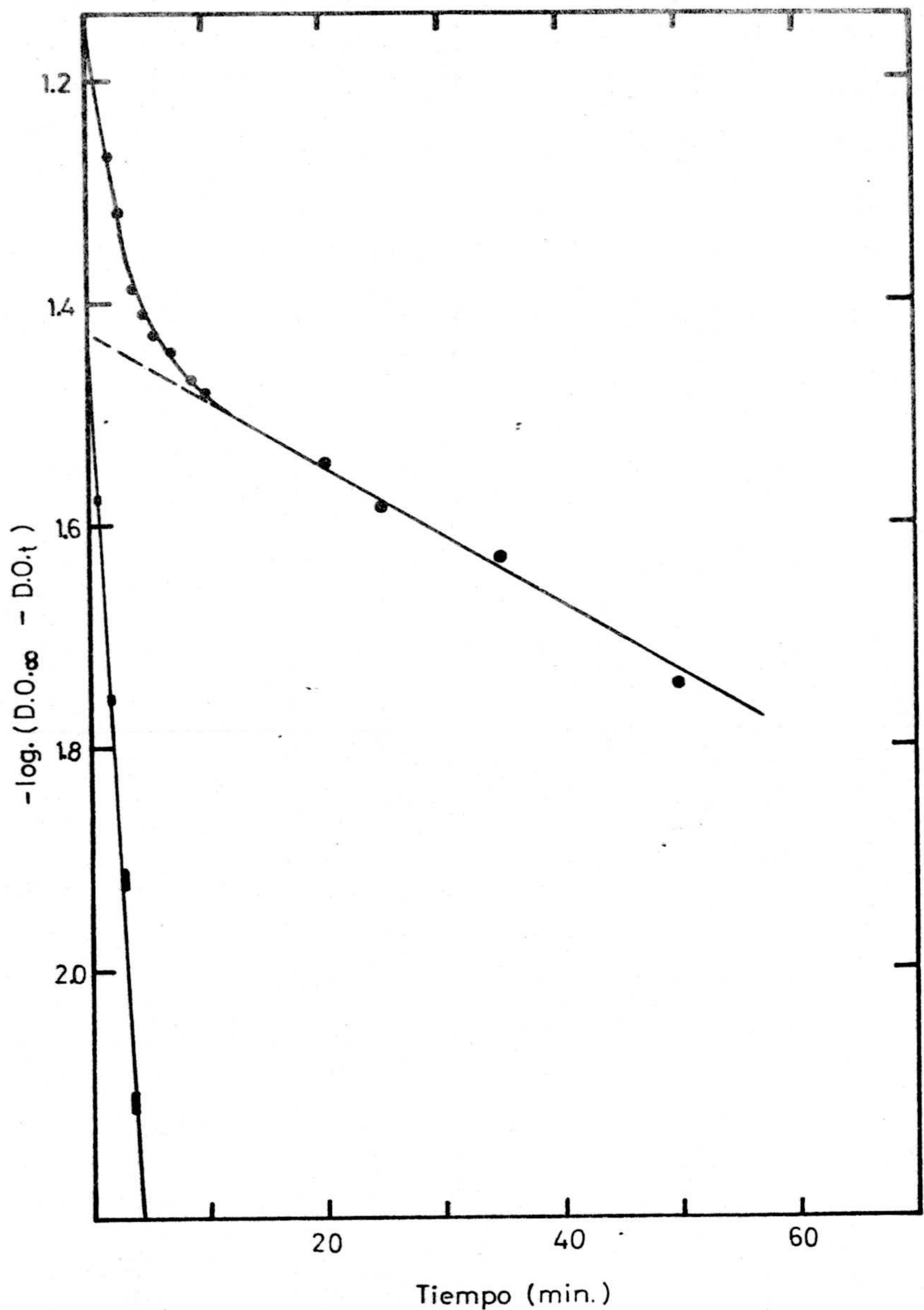


Fig. 57. Ajuste de los datos de la figura 56, según se indica en la parte EXPERIMENTAL

Conobjeto de tratar de encontrar estas dos tirosinas por análisis de aminoácidos, se llevó a cabo el mismo inicialmente utilizando grandes cantidades de sal de Fremy y tiempos de reacción. La concentración de enzima utilizada en este caso también fue mayor que en los experimentos anteriores. A continuación describimos el experimento y los controles que se realizaron.

9. Análisis de aminoácidos. Previamente al análisis de aminoácidos de la enzima tratada con sal de Fremy se llevaron a cabo los siguientes controles:

a) Un análisis de una disolución patrón (figura 58) de aminoácidos donde la concentración de cada uno de ellos era $0,1 \mu\text{M}/\text{ml} = 10^{-4} \text{M}$.

b) Una disolución de tirosina fue introducida en el analizador, después de haberla tratado con sal de Fremy de forma que la relación molar sal de Fremy/tirosina era igual a 10. De la integración de la señal obtenida se podía deducir que un 60% de la cantidad total había sido oxidada por la sal de Fremy. A tiempos de retención inferiores se obtenían pequeñas bandas que en un principio podrían ser asignables al producto de oxidación de la tirosina y posibles subproductos formados en el tratamiento de la muestra antes de ser introducida en la columna. Dado que el producto de oxidación en el caso de las tirosinas no es el mismo que cuando esta posee libre el grupo NH_2 , los experimentos se centraron fundamentalmente en la determinación de las tirosinas que eran oxidadas en la enzima, dejando para posteriores experimentos la identificación de los productos de oxidación por análisis de aminoácidos.

c) Un análisis de aminoácidos de fosforilasa. Una disolución de la enzima de concentración $4,6 \text{ mg}/\text{ml}$ fue adecuadamente hidrolizada y su análisis de aminoácidos respondía al encontrado en la bibliografía (10). Se calcularon $34 \pm 0,5$ tirosinas (fig. 59).

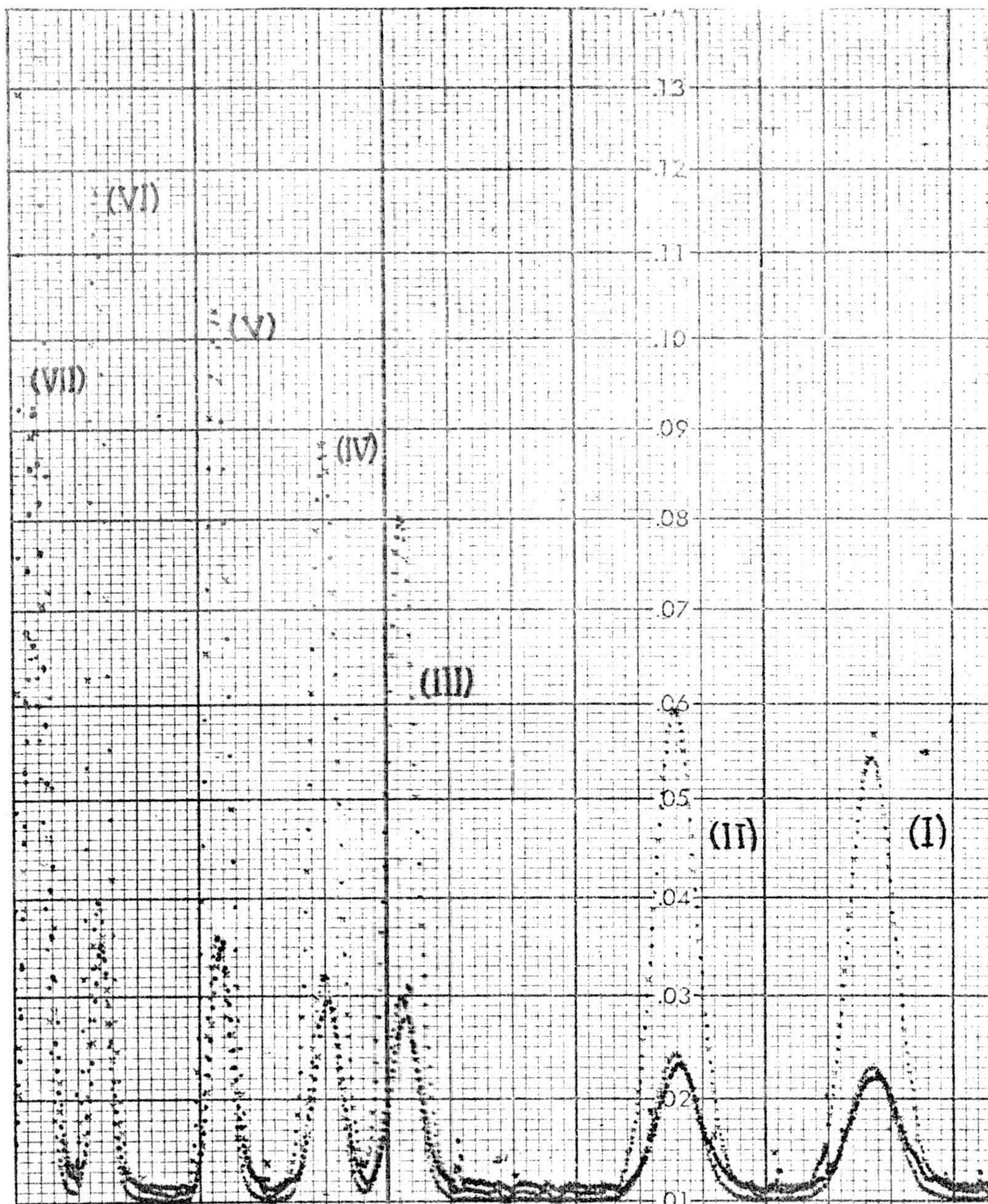


Fig. 58. Análisis de aminoácidos de una disolución patrón, concentración: 10^{-4} M.
 (I), Phe; (II), TIROSINA; (III), Leu; (IV), Ile;
 (V), Met; (VI), Val; (VII), Ala y Gly.

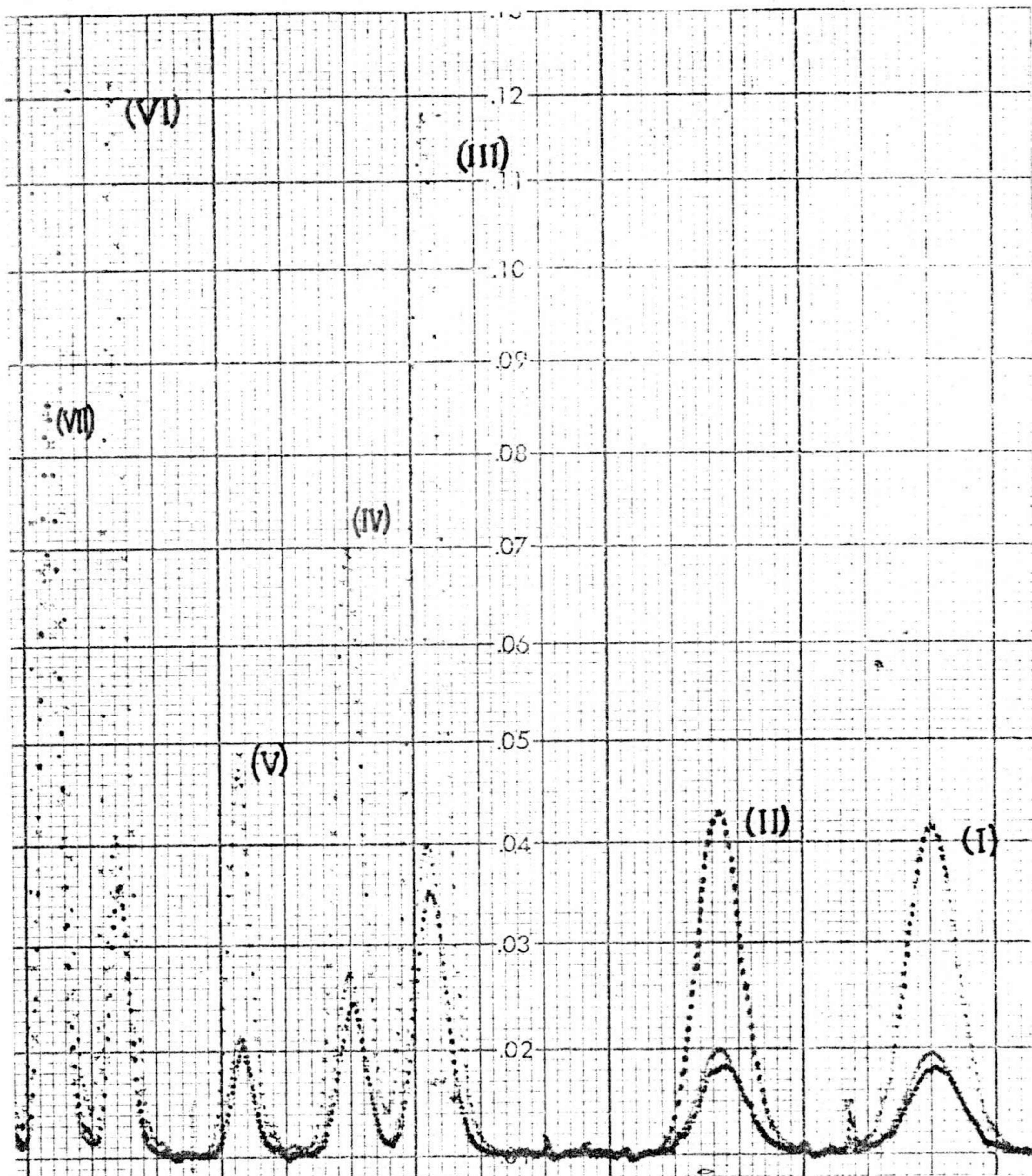


Fig. 59. Análisis de aminoácidos de fosforilasa, concentración: $4,6 \cdot 10^{-5}$ M.
 (I), Phe; (II), TIROSINA; (III), Leu; (IV), Ile;
 (V), Met; (VI), Val; (VII), Ala y Gly.

Una porción de la disolución de fosforilasa anterior (4,6 mg/ml) fue tratada con sal de Fremy, añadiendo una disolución de este reactivo de forma que la relación molar SF/F era igual a 45,5. Después de dos horas de iniciada la reacción, la muestra fue sometida al mismo tratamiento de hidrólisis que aquella de fosforilasa nativa.

En las figuras 59 y 60 se muestran los aminogramas de fosforilasa nativa y tratada con sal de Fremy como se ha descrito.

Después de repetir dos veces todos los experimentos, y sobre las bases de la disolución patrón de aminoácidos y el análisis de aminoácidos de fosforilasa nativa, se podía evaluar un número de tirosinas modificadas que oscilaba entre 5 y 7 según distintos experimentos de este tipo.

Como se puede observar, el número de tirosinas modificadas, determinado por análisis de aminoácidos, parecía ser superior al que cabría esperar a partir de los estudios realizados anteriormente en las mismas condiciones que en este experimento, salvo la concentración de enzima que era bastante superior en la muestra que se utilizó para realizar el análisis de aminoácidos. Esto podría ser simplemente consecuencia del error implícito a la técnica utilizada. Sin embargo, a continuación expondremos el resultado obtenido cuando, utilizando concentraciones de enzima superiores, se determinó el número de tirosinas modificadas midiendo la absorbancia a 380 nm.

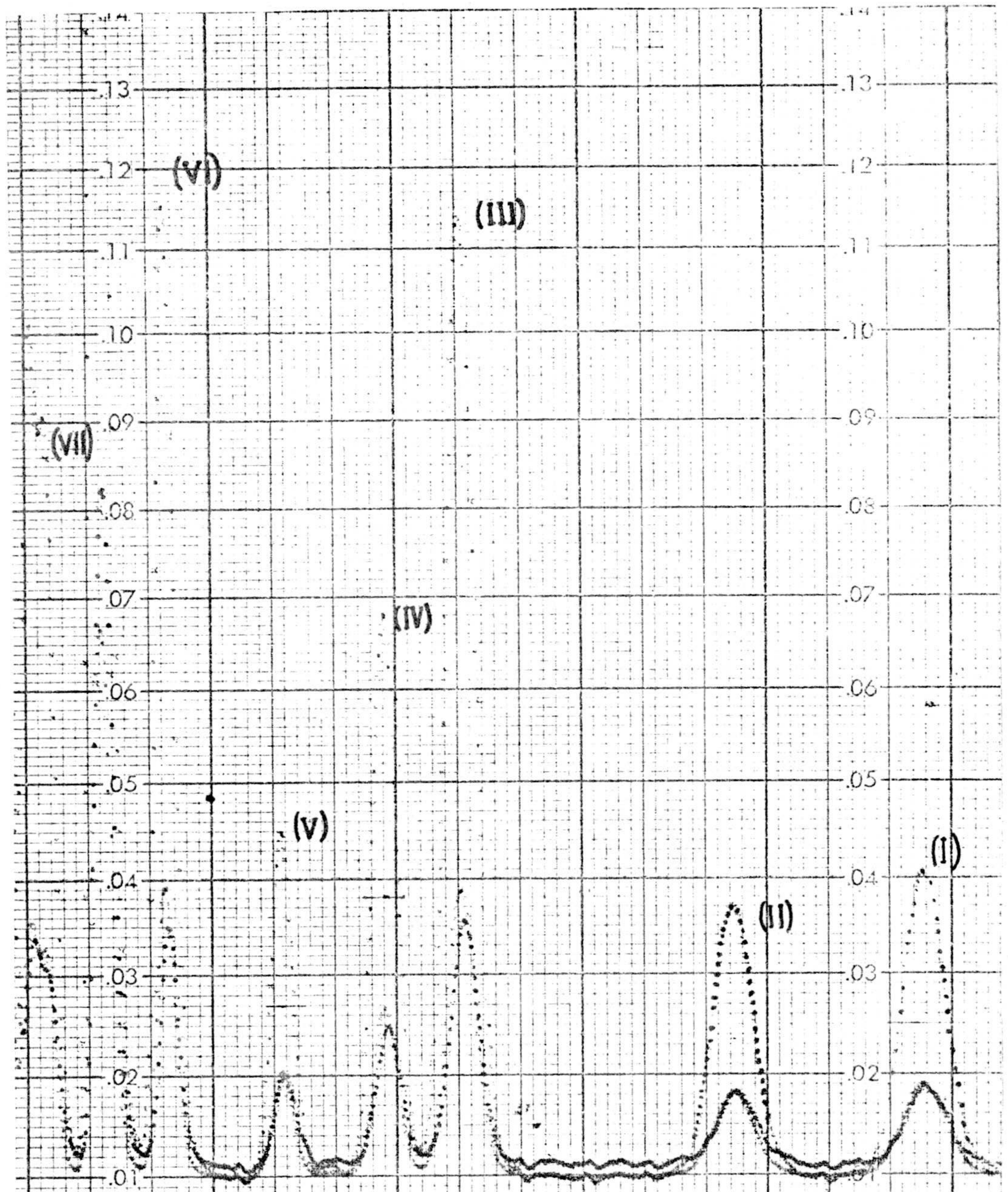


Fig. 60. Análisis de aminoácidos de fosforilasa tratada con sal de Fremy, concentración: $4,6 \cdot 10^{-5}$ M.
 (I), Phe; (II), TIROSINA; (III), Leu; (IV), Ile;
 (V), Met; (VI), Val; (VII), Ala y Gly.

10. Modificación de fosforilasa utilizando mayores con- centraciones de la misma. Como se puede apreciar en la figura 61, el espectro de la enzima marcada con sal de Fremy, cuando se utilizaban concentraciones de la misma superiores a las usadas en los experimentos descritos anteriormente, era análogo al que ya se dio en la figura 50. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia importante y es que mientras que el máximo de la banda de 500 nm. mantiene en ambos casos su misma intensidad relativa, la banda con máximo a 380 nm. ha aumentado considerablemente en el espectro correspondiente a la enzima marcada a alta concentración de la misma. Utilizando dicho máximo, se podía determinar 4 tirosinas modificadas en la enzima marcada con sal de Fremy de forma que la relación molar sF/F era igual a 10 y la concentración de la enzima $5,6 \cdot 10^{-5}$ M.

Este resultado concuerda con el encontrado por análisis de aminoácidos, pareciendo que el comportamiento de la enzima no es el mismo para pequeñas concentraciones de la misma que para concentraciones del orden del triple o cuádruple. Por esta razón, se repitieron las medidas de inactivación en ausencia y presencia de AMP, así como, las cinéticas seguidas a 500nm., utilizando una concentración de enzima del orden de $3-5 \cdot 10^{-5}$ M.

En la tabla XVI se resumen los resultados obtenidos cuando la concentración de enzima era superior a $3 \cdot 10^{-5}$ M.

El comportamiento de la enzima en estas condiciones no es el mismo que el encontrado anteriormente cuando la concen

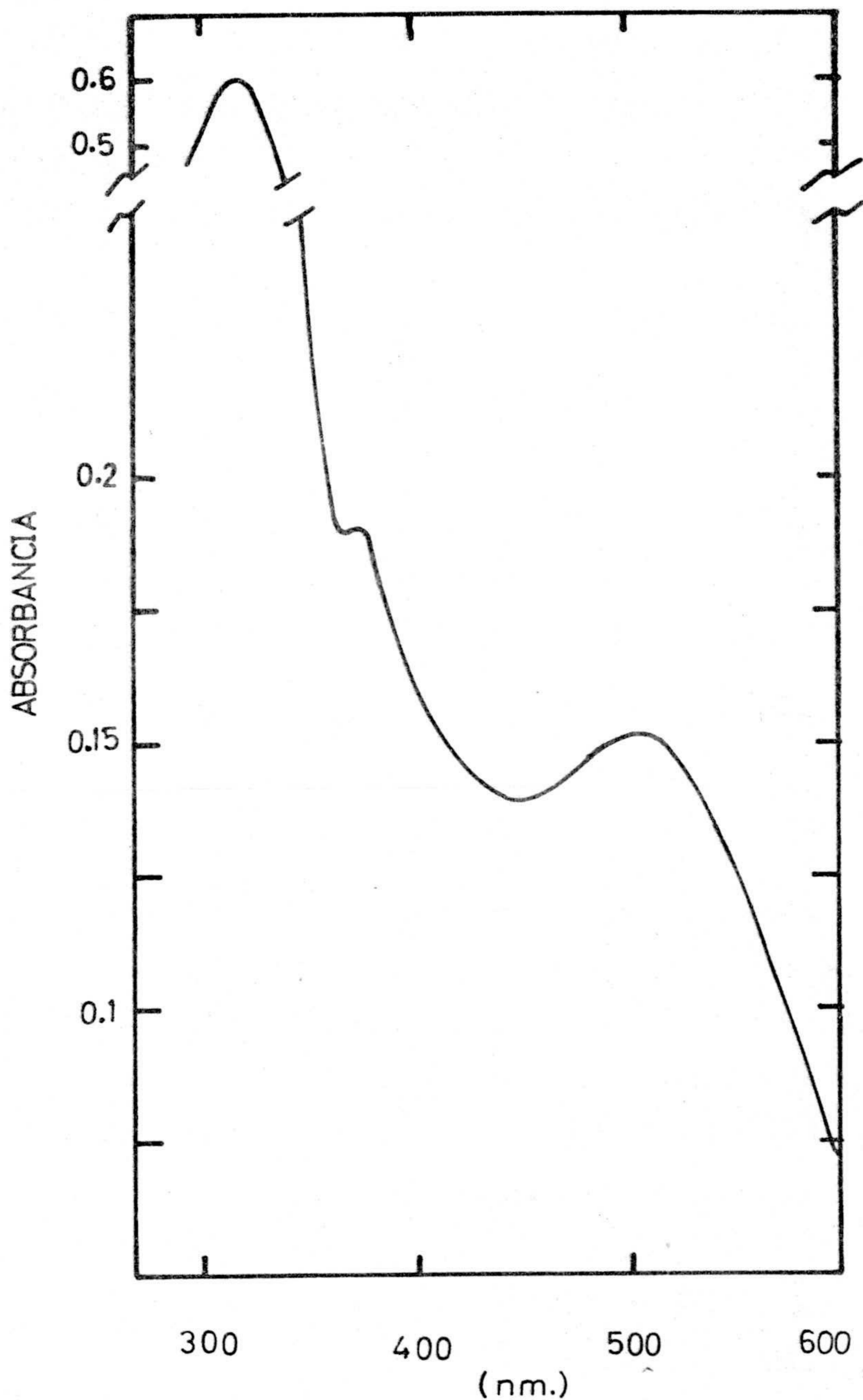


Fig. 61. Espectro de diferencias de fosforilasa tratada con sal de Fremy vs. no tratada.
 fosforilasa, $5,65 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA 1 mM., pH 7,5.
 relación molar sF/F = 12.

tración de la enzima no era superior a $1,5 \cdot 10^{-5}$ M. La protección ejercida ahora por el AMP frente a la inactivación es mucho menos efectiva.

TABLA XVI

Inactivación de la enzima por sal de

Fremy.

condiciones	actividad(%)
con AMP(1 mM)	10
sin AMP	0,0

fosforilasa, $3 \cdot 10^{-5}$ M.

relación molar sF/F = 11

el control mantenía la actividad habitual en fosforilasa.

La cinética de la reacción seguida a 500 nm. , también ofrecía unas características diferentes. Esta cinética (fig. 62) se podía ajustar a dos de pseudo primer orden. Es decir, usando siempre la misma relación molar sF/F igual a 10, cuando la concentración de fosforilasa es del orden de $1,3 \cdot 10^{-5}$ M obtenemos una sola cinética. Cuando la concentración es del orden de $5 \cdot 10^{-5}$ M. se pueden distinguir dos cinéticas, una de ellas con una velocidad similar a la encontrada a baja concentración, $K = 660 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y otra con una constante de velocidad un poco inferior $K = 210 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Evidentemente estos últimos resultados deben hacer pensar que el comportamiento de la enzima a alta concentración es diferente del que presenta cuando ésta es inferior a $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

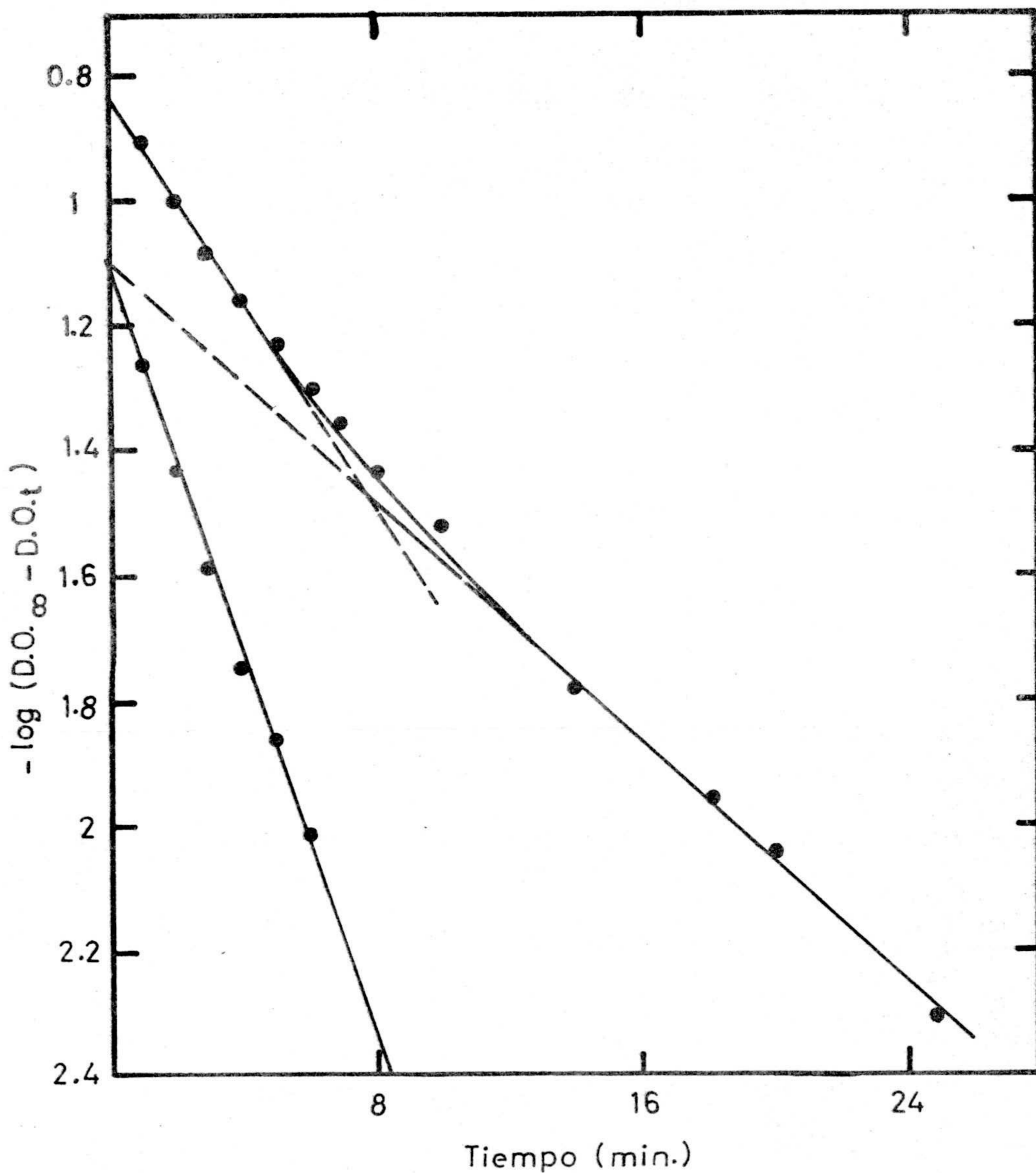


Fig. 62. Cinética de la reacción de sal de Fremy con fosforilasa seguida midiendo la absorbancia a 500 nm. fosforilasa, $5,5 \cdot 10^{-5}$ M. en tris- Cl^- 0,05 M., EDTA, 1 mM., pH 7,5. relación molar sF/F = 9,6. Los datos se ajustaron como se indica en experimental.

11. Otros restos aminoácidos. Finalmente, se estudió la posibilidad de que se produjera una oxidación de las cisteínas de la enzima que pudiera influir en la pérdida de actividad de la misma.

Como se ha dicho anteriormente, la sal de Fremy no daba ningún producto de oxidación, detectable espectrofotométricamente, al ponerla en presencia de ME y L-cisteína. Sin embargo, dada la capacidad de la enzima para catalizar reacciones que no serían de esperar en condiciones normales es conveniente asegurarse de que los grupos -SH no ejercen una influencia decisiva sobre la pérdida de actividad.

El tratamiento de la enzima con la sal de Fremy producía la modificación de dos cisteínas por monómero de fosforilasa (tabla XVII). En estas condiciones, la pérdida de actividad era total. Cuando la enzima se incubaba con ME, de una a dos cisteínas se podían recuperar, sin embargo la pérdida de actividad era completamente irreversible.

TABLA XVII

Recuperación, por incubación con ME, de cisteínas modificadas

-SH/monómero modificados	actividad(%)	-SH/monómero* modificados	(%) actividad
3	0	2	0
1,25	0	0	0
1,7	0	1,0	0
1,5	0	1,0	0

fosforilasa, $4-5 \cdot 10^{-5}$ M.

* después de incubar 1 hora a 30 °C. y 18h a temp. ambiente

Teniendo en cuenta que las condiciones de reacción eran las mínimas necesarias para producir la inactivación de la enzima, sería lógico pensar que si la modificación de las cisteínas fuera en este caso decisiva en la inactivación, su parcial recuperación debería ser paralela a una parcial recuperación de la actividad. Al no ocurrir así, podemos pensar que las cisteínas que son modificadas son las que hemos llamado rápidas (no influyentes en la actividad) y si se produjera una cierta modificación de las "lentas" no recuperable por incubación con ME nunca daría lugar a la total inactivación de la enzima. Así la inactivación de la enzima sería fundamentalmente consecuencia de la modificación de dos residuos de tirosina.

Como se puede observar en la tabla XVII, los experimentos de determinación del número de grupos -SH modificados se llevaron a cabo a altas concentraciones de enzima. Esto es inevitable por razones experimentales ya que después de incubar con ME es necesario eliminar dicho producto para determinar cisteínas en la enzima, mediante el uso de DTNB. Esto implica la necesidad de utilizar concentraciones elevadas de enzima de forma que al eliminar el ME pasando por una columna de sephadex G-25, la concentración resultante de la misma sea suficiente para poder determinar espectrofotométricamente el número de -SH valorables, como se describe en la parte EXPERIMENTAL.

Por esta razón, la comprobación del número de grupos -SH modificados en las condiciones en que se produce la inactiva

ción de la enzima cuando se utilizan pequeñas concentraciones de la misma se hace prácticamente imposible. Así, con objeto de estudiar la posible influencia de los grupos -SH en la inactivación de la enzima, se llevó a cabo la reacción en presencia de un exceso de ME. Si hacemos la hipótesis de que la inactivación es consecuencia de una modificación de cisteínas, la presencia de un exceso de ME protegería a los grupos -SH de la modificación con sal de Fremy y no se produciría la inactivación.

TABLA XVIII

Inactivación por tratamiento con sal de Fremy en presencia de un exceso de ME.

A)		B)	
sF/F	actividad(%)	sF/F	actividad(%)
0,0	100	0,0	100
2,5	61	2,5	100
5,0	42	5,0	95
10	22	10	85

fosforilasa, $1,4 \cdot 10^{-5}$ M.; ME, 1 mM.

A) en ausencia de AMP

B) en presencia de AMP

tiempo de reacción: 35 minutos.

En la tabla XVIII se resumen los resultados de este experimento. La hipótesis formulada no es válida puesto que se produce una desactivación de la enzima. El AMP, como en los experimentos descritos inicialmente protege casi totalmente a la enzima de la inactivación.

DISCUSSION

A) POLAROGRAFIA Y ESPECTROSCOPIA

Como ya se ha citado en la introducción, acerca de la naturaleza del enlace del PLP a la fosforilasa se postularon dos soluciones que en un orden cronológico son la formación de una aldimina substituida (I p.19), o bien una base de Schiff en una bolsa hidrofóbica (I, p.21). Con objeto de dilucidar ambas posibilidades, se han realizado estudios de absorción y fluorescencia de PLP, PLP-cisteína y bases de Schiff del PLP en agua y otros medios no acuosos(31). De los resultados obtenidos con estos últimos modelos, bases de Schiff del PLP en medios acuosos y no acuosos, se puede deducir que la estructura más probable del sitio de unión del PLP a la fosforilasa sea la de una base de Schiff en un medio hidrofóbico. Honikel et al(34), sin embargo, de los resultados citados sobre absorción y fluorescencia de bases de Schiff del PLP, postulaban la estructura de aldimina substituida para dicho sitio. Posteriores investigaciones con estos modelos(98) demuestran que la estructura del sitio debe responder a la citada base de Schiff embebida en una bolsa hidrofóbica.

Con objeto de conseguir una aproximación más completa a la estructura del sitio del PLP en fosforilasa, se ha estudiado en esta memoria el complejo PLP-albúmina el cual presenta al igual que la fosforilasa un máximo de absorción, a pH neutro, a 335 nm. y no puede ser reducido con NaBH_4 .

En este sentido, se procedió a caracterizar los sitios I y II de la albúmina. De los resultados obtenidos se puede deducir que a pH 7 existen los dos sitios indiscutiblemente. Christensen(80) infería que había un sitio II aunque no demostraba su existencia. La valoración de albúmina con PLP siguiendo medidas de fluorescencia (fig. 18), no deja lugar a dudas sobre la existencia de dicho sitio.

Como se puede observar en las figuras 16 y 17, únicamente cuando se ha formado el complejo correspondiente al sitio I, comienza a formarse el correspondiente al sitio II, indicando esto que la constante de equilibrio correspondiente al sitio I (de formación) es mayor que la correspondiente al sitio II. Una estimación de la constante de equilibrio para ambos sitios se hace muy difícil utilizando concentraciones del orden de 10^{-5} M. Sin embargo, cuando se usan concentraciones un orden más pequeñas, el uso de células de 10 cm. de paso de luz (para conseguir una sensibilidad mínima en las medidas) permite obtener unas curvas de valoración más asequibles al cálculo de constantes de equilibrio. El objetivo de la realización de estos experimentos era la comprobación de la existencia de ambos sitios y que el sitio I (que simula más adecuadamente las propiedades del sitio de unión de PLP a fosforilasa) presentaba una constante de equilibrio mayor que la correspondiente al sitio II, asegurándonos de esta forma de su existencia exclusiva en unas determinadas condiciones experimentales. Por esta razón no realizamos una evaluación de las constantes de equilibrio, que por otra parte

estarían sometidas a un gran margen de error, dada la magnitud de las mismas.

Las estructuras dadas por Christensen(80) para ambos sitios I y II, son solo algunas de las posibles. Actualmente sabemos, por los trabajos de Shaltiel y Cortijo(28-31) que además puede existir la estructura representada por una base de Schiff en una bolsa hidrofóbica. Aunque no se ha pretendido, en este trabajo, tratar de demostrar que el sitio I posea una determinada estructura, conviene hacer unos comentarios a la vista de los resultados obtenidos.

Por el estudio de modelos simples, se sabe que una aldimina substituida (con hibridación sp^3 en el carbono 4' del PLP) absorbe a 335 nm. en un medio acuoso, y a 290 nm. en un medio hidrofóbico. Por otra parte, la base de Schiff (con hibridación sp^2 en el carbono 4' del PLP) absorbe a 415 nm. en un medio acuoso y a 335 nm en medios hidrofóbicos. Si se conociese la polaridad del medio que rodea al sitio I podría decidirse, sin lugar a dudas, por una estructura u otra. Si está en un medio hidrofóbico se trataría de una base de Schiff. Si está en un medio hidrofílico, sería una aldimina substituida.

Como se puede deducir de los resultados de reducción polarográfica (que se comentan posteriormente) el sitio I presenta un carácter hidrofóbico por lo que tendríamos que admitir que la estructura del mismo corresponde a la de una base de Schiff y no a una aldimina substituida.

La principal diferencia entre los sitios I y II sería la

polaridad del medio en que se encuentran. Se podrían estimar, haciendo uso de la referencia 99, las polaridades de ambos sitios I y II, como $Z = 75,2$ para el sitio I y $Z = 87,1$ para el sitio II a partir de sus absorciones relativas a 335nm y 415 nm; donde Z es el parámetro empírico de Kosower (100). Una idea de esta polaridad se puede obtener del hecho de que una mezcla DMF-agua al 5% en agua tiene un valor $Z = 75,0$ y al 40% de agua de $Z = 87,1$ (99).

Como se puede observar en la figura 18, la emisión de fluorescencia a 350 nm disminuye cuando aumenta la cantidad de PLP añadido sobre la albúmina. Si tenemos en cuenta que esta emisión de fluorescencia debe corresponder al triptófano excitado a 280 nm, podemos pensar que nos encontramos ante un fenómeno de disminución del rendimiento cuántico ("quenching") correspondiente al donador por transferencia de energía al sitio del PLP. Suponiendo un mecanismo de transferencia no radiativo, se podría aplicar el tratamiento de Perrin-Forster (101) en el cálculo de la distancia entre ambos cromóforos. Si los dos triptófanos de la albúmina (102) están emitiendo puede calcularse la transferencia de energía, T , a partir del decaimiento de fluorescencia a 350 nm, obteniendo un valor del 45% ($T = 1 - Q_t/Q_0$) (101). Puesto que la eficiencia de la transferencia está relacionada con la distancia entre los dos cromóforos ($R^6 = R_0^6/T - R_0^6$) (101), obtendríamos que $R = 1,03 R_0$, donde R_0 es la distancia entre ambos cromóforos a la cual la constante de velocidad para la transferencia es igual a la constante de velocidad para la

desactivación espontánea del donador. Un valor de $R_0 = 21 \text{ \AA}$ fue tomado de los resultados obtenidos para dicha pareja de cromóforos en fosforilasa b (28), la cual presenta unas análogas características de absorción y fluorescencia. Con este valor de R_0 , se puede suponer que la distancia media entre los dos triptófanos y el PLP sea de 21 \AA .

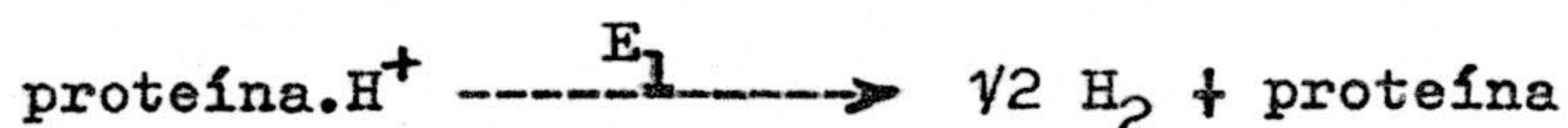
Cuando Shaltiel y Cortijo (29) encontraron que una base de Schiff, en un medio hidrofóbico, podía simular las propiedades de absorción y fluorescencia de la fosforilasa, intentaron encontrar una explicación razonable al hecho publicado por Fischer et al. (21) de que, a pH neutro, el PLP no podía ser fijado irreversiblemente a la fosforilasa por reducción de la misma con NaBH_4 . Aunque aquellos autores publicaron una explicación (29), podía ser interesante comparar la conducta polarográfica de la enzima con la de compuestos modelos simples, y con la de los complejos PLP-albúmina, con objeto de mejorar el conocimiento acerca de esa imposibilidad de reducción con NaBH_4 .

Acerca del complejo PLP-albúmina, presenta en este sentido la misma característica que la fosforilasa, es decir, no se puede reducir a pH neutro con NaBH_4 , siendo ésta una de las razones por la que se eligió este complejo para simular el sitio del PLP en fosforilasa.

Tanto el complejo PLP-albúmina (sitio I) como el adscrito al sitio II presentan a pH ácido ondas que hemos asignado a la presencia de PLP libre en la disolución, como consecuen

cia de que a esos pH se produce la disociación del complejo PLP-albúmina. Una situación similar se produce en fosforilasa, la cual presenta a pH ácido ondas correspondientes a PLP libre en la disolución después de ser liberado por la enzima en esas condiciones. (103)

Vamos a comentar, a continuación, los resultados de la polarografía de fosforilasa a pH neutro, así como de la albúmina y sus complejos con PLP a este pH. Como ya se ha indicado en el capítulo de resultados, la holofosforilasa, apofosforilasa, albúmina y sus complejos presentan ondas de reducción a potenciales de onda media que oscilan alrededor de -1,1 volts. Las características que presentan estas ondas respecto a la variación de potenciales de onda media, intensidades y coeficientes $n\alpha$ con la altura de la columna de mercurio, concentración de sustancia electroactiva, etc hacen pensar que esta onda es de naturaleza catalítica. El hecho, además, de que se da tanto en albúmina como en fosforilasa parece indicar que es una onda característica de la presencia de una sustancia proteica en la disolución. Esta onda es debida, probablemente, a un proceso de descarga de hidrógeno como consecuencia de una reducción más fácil de la proteína protonada (probablemente adsorbida), que de los mismos protones (95). El esquema de esta onda sería el siguiente:



de forma que su potencial, E_1 , es menos negativo que E_2 , el potencial de semionda del proceso de descarga de hidrógeno:



Este tipo de ondas catalíticas es descrito a menudo en la bibliografía (95) y desde luego, teniendo en cuenta que tanto la holoenzima como la apoenzima la presentan en las mismas condiciones, podemos afirmar que dicha onda no tiene ninguna relación con una posible reducción del sitio del PLP sobre la fosforilasa.

Los complejos PLP-cisteína, las bases de Schiff del PLP, y el mismo PLP, presentan, en disolución acuosa, ondas con potenciales de onda media menos negativos que -1,0 volts., antes de la aparición, en fosforilasa, de la onda catalítica. Si en la enzima o en el complejo PLP-albúmina (sitio I) se encontrara presente alguna de las estructuras representadas por estos complejos en medio acuoso, deberíamos obtener una onda a esos potenciales. Puesto que no ocurre así, podemos concluir que dichas estructuras no se encuentran en la enzima uniendo al PLP. Esto significaría que el sitio del PLP en fosforilasa, así como el del PLP en albúmina (sitio I) no tienen carácter hidrofílico, confirmando los resultados de espectroscopía de absorción y fluorescencia (31).

Los complejos PLP-cisteína y bases de Schiff del PLP (35) en DMF, presentan ondas con potenciales de onda media más ne

gativos que $-1,3$ volts. El sitio I en albúmina, y la fosforilasa presentan ondas alrededor de $-1,1$ volts. debidas a la ya conocida onda de descarga de hidrógeno. Por otra parte, resulta imposible encontrar ondas a potenciales más negativos que $-1,4$ volts. debido a que, aun cuando los fondos utilizados en alguna ocasión presentaran su descarga a potenciales de $-1,8$ volts., la presencia de proteína en la disolución inducía la aparición de la descarga del fondo a potenciales menos negativos que $-1,4$ volts. Teniendo en cuenta esto último y la presencia constante de la onda catalítica, no se puede descartar que los complejos PLP-cisteína o bases de Schiff del PLP, en DMF, puedan simular la naturaleza del sitio de unión del PLP a la fosforilasa, con la única ayuda de los potenciales de semionda encontrados.

El hecho de que no podamos encontrar una onda a potenciales menos negativos que $-1,1$ volts. sería una prueba de que el sitio del PLP en fosforilasa como en albúmina (sitio I) se encuentran embebidos en una bolsa hidrofóbica, por lo tanto, y de acuerdo con lo dicho en la página 186, solo sería posible una estructura de base de Schiff.

Una situación similar ocurre con las bases púricas que son reducidas electroquímicamente, en disolución acuosa, pero no lo son cuando se encuentran en polinucleótidos (104).

El complejo PLP-albúmina (sitio II) presenta una onda a un potencial próximo a $-0,9$ volts. Esto sugería que la fosforilasa en un medio "deformante" como el citrato de imidazol $0,4$ M. podría dar una onda polarográfica a pH neutro.

Efectivamente, a pH neutro, y a baja temperatura, se obtiene una onda con un potencial de onda media próximo a -0,95 volts, mientras que, en las mismas condiciones, la apoenzima sigue dando la onda catalítica a potenciales de -1,1 volts. Esta onda que aparece en fosforilasa "deformada" podría ser que se tratara de dos ondas solapadas, similarmente a lo que ocurre en la polarografía de PLP-albúmina (sitio II) a pH neutro, aunque en el caso de fosforilasa su separación se hace prácticamente imposible (fig.28). La onda a potenciales menos negativos podría ser: 1) PLP libre, que aparece próximo a esos potenciales de onda media. Si así fuera, el equilibrio



tendría que ser muy rápido en este medio. Esto es poco probable puesto que este equilibrio, en medios acuosos, e incluso en medios apolares es lento (105,106). 2) Podría suceder que el agente deformador expusiera al PLP a un medio de polaridad intermedia, siendo la reducción de la base de Schiff del PLP la causante de la aparición de la onda a potenciales de onda media próximos a -0,95 volts. Esto estaría de acuerdo con el "quenching" de la fluorescencia (42) en citrato de imidazol 0,4 M. y el ligero aumento de la absorbancia a 415 nm. que presenta la fosforilasa en este medio deformante(42).

Tenemos, pues, que los modelos simples presentan ondas de reducción, en medios no acuosos, con potenciales de onda media más negativos que -1,3 volts. La fosforilasa y el complejo PLP-albúmina (sitio I) no presentan ondas a potenciales

menos negativos que $-1,1$ volts. Hemos concluido que tanto en albúmina como en fosforilasa el PLP se encuentra embebido en una bolsa hidrofóbica. Podemos, ahora, dar una explicación al hecho de que tanto la enzima como el complejo PLP-albúmina (sitio I) no puedan ser reducidos con NaBH_4 , a pH neutro, : la especie activa del NaBH_4 en agua, BH_3 , (107), tiene un potencial anódico de onda media de $-0,64$ volts., siendo por consiguiente imposible, por razones termodinámicas, la reducción a pH neutro del PLP en el complejo PLP-albúmina (sitio I), así como en fosforilasa.

B) MODIFICACION QUIMICA
MEDIANTE EL USO DE TNM

Se buscaron, en primer lugar, las condiciones necesarias para conseguir una inactivación prácticamente total utilizando las cantidades mínimas necesarias de reactivo y tiempos de reacción. Esto tendría por objeto el procurar bloquear el mínimo número de residuos posibles, y si lo fuera, de uno solo. Si esta condición ideal no se encontrara, la interpretación de los resultados sería de poca utilidad. Si se consigue marcar muy pocos residuos o uno solo, serían posibles las siguientes alternativas:

1) La actividad no se modifica. Esto significa que este residuo no es importante desde el punto de vista catalítico ni conformacional. Esta situación parece poco interesante, desde un punto de vista relación estructura-función de la enzima, y ha sido eliminada "a priori".

2) Se produce la inactivación enzimática. En este caso existen varias alternativas para explicar el hecho, referentes a la implicación del residuo en el sitio catalítico o de alguno de los efectores, y serán discutidas en la medida de las posibilidades de este trabajo a continuación.

Como consecuencia de los experimentos descritos en RE -
SULTADOS, se encontró que era necesaria una relación molar
TNM/F al menos igual a 10 para conseguir la inactivación,
pues relaciones molares inferiores conducían a inactivacio -

nes parciales (fig. 34). Usando aquella relación, el tiempo necesario encontrado era de dos a tres horas. Dicho tiempo coincide con el necesario para conseguir una estabilidad en el incremento de absorbancia a 381 nm. (fig. 42). Por último, se hizo necesaria la incubación de las muestras con ME, una vez acabada la reacción, para asegurarnos de que la inactivación era solo función del tratamiento con TNM.

Según los resultados encontrados en la bibliografía con compuestos modelos (56) y otras enzimas (58-60), el TNM unicamente afecta, en condiciones suaves de reacción, a los residuos aminoácidos de tirosina y cisteína. Una vez encontradas las condiciones óptimas de reacción, desde un punto de vista de inactivación, se procedió a la determinación del número de residuos de tirosina y cisteína que habían sido afectados en las citadas condiciones.

Según las tablas X y XI y las figuras 39 y 40 el trata-miento con TNM da lugar a la modificación de tirosinas y cisteínas. Respecto a esta última, la inactivación es total - cuando se han valorado 4 grupos -SH. Esto coincide con el resultado encontrado con otros reactivos, p-CLMB (5), DTNB(40) y iodoacetamida (37-39).

Como se ve en la figura 40, la curva de inactivación crece muy rápidamente aun cuando la relación molar TNM/F sea pequeña. Así, por ejemplo, para una relación molar TNM/F = 2,5 la inactivación es del 50%, necesitándose una relación doble para el 75%, y cuádruple para la prácticamente total inacti-ción. Sin embargo, la curva del número de grupos -SH modifi-

cados aparentemente es sigmoïdal. Estos hechos podrían explicarse con el modelo alostérico de Monod et al. (108) de cooperatividad homotrópica. En la figura 63 exponemos un esquema para tratar de explicar como ocurriría la inactivación y el bloqueo de grupos -SH en función del tratamiento con TNM. En la parte superior tenemos cuatro moléculas nativas de fosforilasa (estado TT de la terminología de Monod et al.). Cuando se añade un ligero exceso de reactivo (el cual depende de la clase de reactivo utilizado), un número determinado de moléculas reacciona con el TNM. En la segunda línea hemos representado dos moléculas después de haberse modificado un grupo -SH "rápido" (pep. nº 3) en uno de los monómeros de cada molécula (estado RT de la terminología de Monod et al.). En estas condiciones, la reacción con el otro grupo -SH "rápido" del otro monómero está muy facilitada, siendo por consiguiente más preferible el ataque por TNM a este grupo que a cualquier otro, dando lugar a la situación RR que representamos en la tercera línea. La razón de esa preferencia puede deberse a las diferencias entre los cambios de energía libre de las dos transiciones ΔG_1 y ΔG_2 .

Ambos cambios de energía libre pueden considerarse como suma de dos contribuciones: (ΔG_a), debido a la reacción química con el reactivo y al cambio de conformación que sufre el monómero, e (ΔG_b), consecuencia del aumento de entropía. Como los dos monómeros de fosforilasa son iguales (109,110), (ΔG_a) deberá ser el mismo para ambas transiciones, pero no (ΔG_b), puesto que, en nuestro caso, la segunda transición

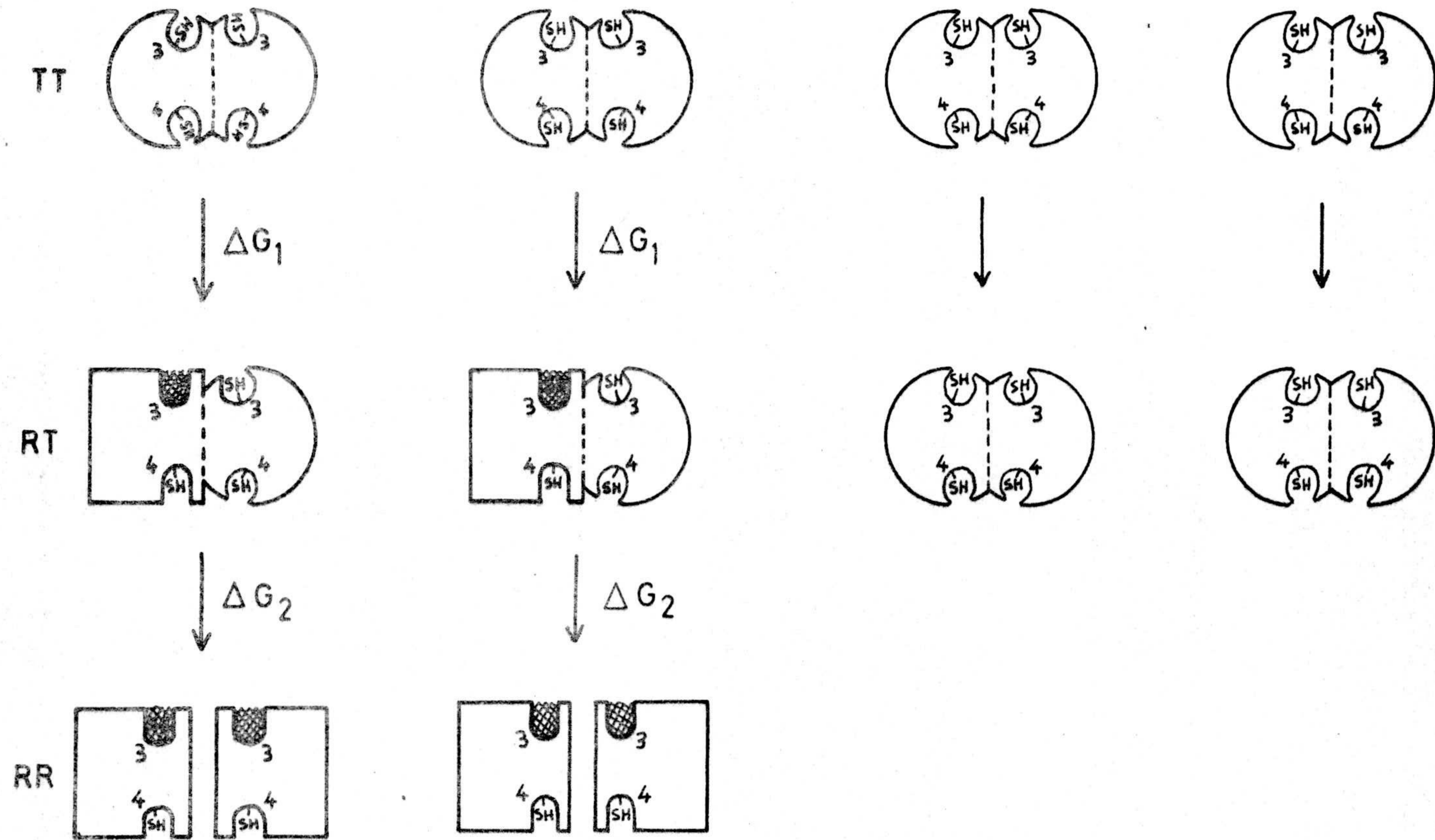


Fig. 63

implica disociación, la entropía ganada en esta etapa sería mayor que en la primera, y la suma de las dos contribuciones dará $\Delta G_1 > \Delta G_2$, siendo por tanto más fácil de realizar el segundo proceso que el primero.

En estas condiciones (de cantidad de reactivo utilizado) la pérdida de actividad es de un 50%, mientras que el número de grupos -SH bloqueados es de un 25%.

Cuando se añade una cantidad de reactivo doble que la anterior, supongamos que se ataca una molécula nativa más que antes, y como hay más reactivo que en el caso anterior (y tiempo suficiente) se modificarían cuatro de los grupos -SH "lentos". Esto significa que se ha perdido un 75% de actividad y que se han valorado un 63% de grupos -SH. Por último, con cantidades muy grandes de reactivo se inactiva completamente la enzima y se bloquean todos los grupos -SH "rápidos" y "lentos".

Como dice Monod et. al. (108), su modelo explica el trabajo de Madsen et. al. (5) en el cual se observó que la fosforilasa a se disociaba en monómeros en presencia de p-Cl MB. Cuando las cantidades usadas de este reactivo eran insuficientes para disociar toda la proteína, la fracción no disociada no contenía nada de p-ClMB.

Según los resultados, cuando se han modificado cuatro grupos -SH se ha producido la total inactivación de la enzima. Esto, en principio, podría suponer que los cuatro tioles son necesarios para la actividad. Cuando el número de grupos -SH bloqueados es inferior, por ejemplo, dos, la pérdida de

actividad es de un 60%. Este resultado está en contradicción con los encontrados sobre modificación de grupos -SH con otros reactivos (37-40), en los que se deduce que dos grupos -SH por monómero (pep. nº 1 y nº 2) reaccionan rápidamente y no son decisivos sobre las propiedades enzimáticas, siendo los tioles de los péptidos nº3 y nº4 los fundamentales para mantener las propiedades enzimáticas. Esta contradicción podría resolverse teniendo en cuenta que cuando se determinan dos tioles, estos pueden ser el resultado de la modificación parcial de los correspondientes a los péptidos nº1 y nº2 y de alguno de los correspondientes a los péptidos nº3 o nº4.

Una de las posibles causas de la inactivación puede deberse al hecho de que al modificarse un tiol o más se impide la unión de los substratos o del activador alostérico, AMP.

En la figura 64 se ilustran tres posibles esquemas que explicarían la inactivación por modificación de los grupos -SH. En la posibilidad A, uno de los dos grupos -SH está en el sitio catalítico. Cuando se modifican uno de ellos o ambos, se pierde la actividad. En principio podríamos desechar esta posibilidad, ya que la enzima modificada solo une el 50 % de moléculas de AMP de las que une la enzima nativa. Este esquema sería compatible si el AMP estuviera en el sitio activo lo que está desechado actualmente dadas las fuertes interacciones heterotrópicas entre el sitio del AMP y el de los substratos (9,10).

En la posibilidad B, el AMP no puede entrar en "su" sitio porque está impedido al modificarse uno o dos grupos -SH

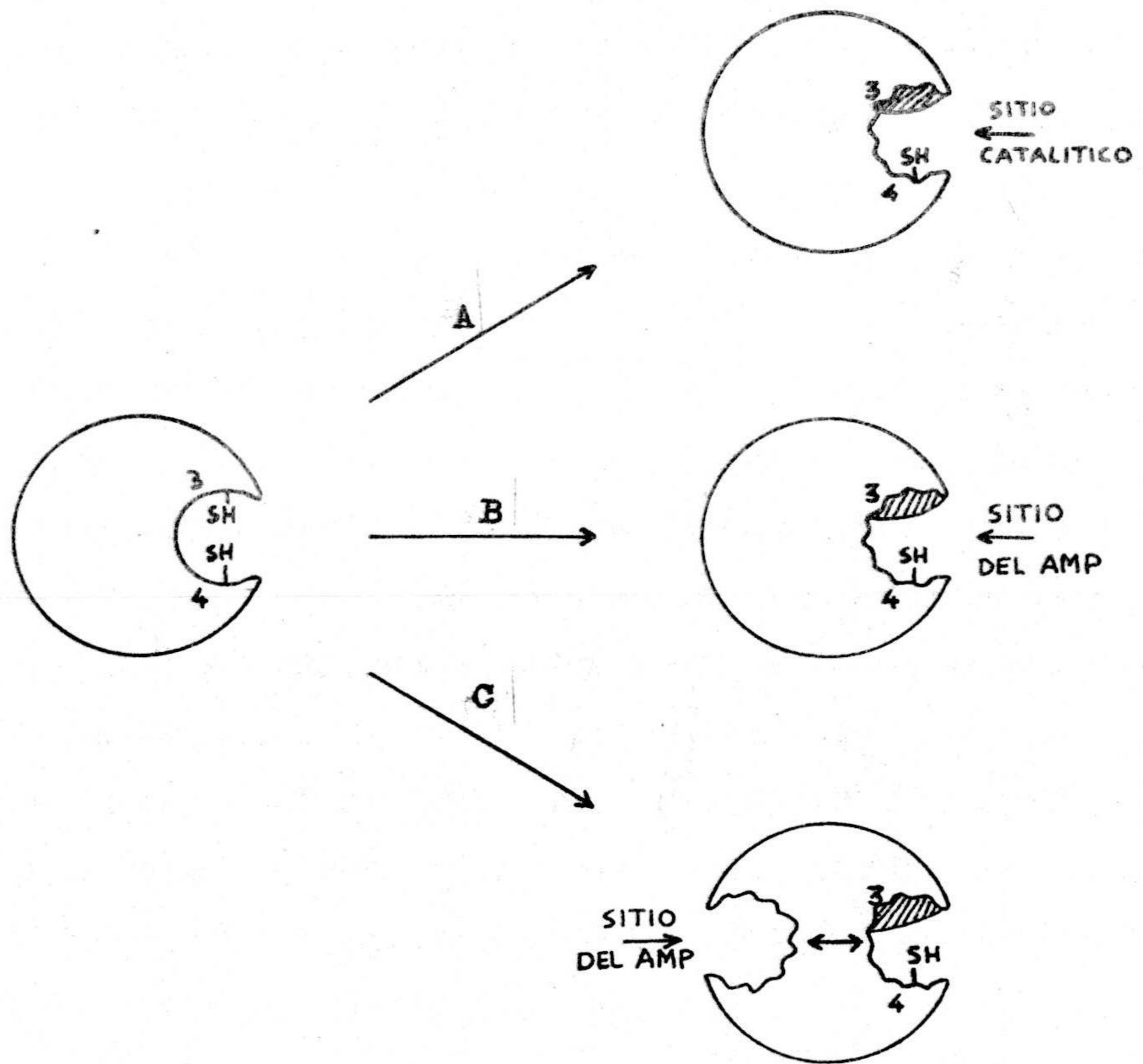


Fig. 64

En la posibilidad C, el AMP no se enlaza porque se modifica su sitio de unión por interacción heterotrópica al bloquear uno o ambos -SH.

Ambas posibilidades, B y C, son posibles. Más información se puede obtener de los resultados de modificación e inactivación en presencia de AMP. En la figura 65 damos otro esquema que tendría en cuenta la reacción con TNM en presencia de AMP. En la posibilidad a), el grupo -SH 3 está en el sitio del AMP, por consiguiente su bloqueo por TNM estaría impedido y se protegería parcialmente la pérdida de actividad. Esta posibilidad, sin embargo, deberíamos desecharla ya que la presencia de AMP protege el bloqueo del residuo 4 con el uso de otros reactivos como DTNB (41), pero no protege al nº 3. Baumert et al. (111) han encontrado que el bloqueo de un grupo -SH impide la unión de AMP a fosforilasa. Kastenschmidt et al. (74) demostraron que la modificación de dos grupos -SH de fosforilasa con DTNB conducía a pérdidas de la cooperatividad homotrópica de la enzima para el AMP. Asimismo, se deben excluir las posibilidades que supongan la protección de más de un residuo por el AMP puesto que hemos encontrado que solo se marcan tres en su presencia frente a cuatro cuando el AMP no está presente. En la posibilidad b), el grupo -SH 4 está en el sitio del AMP, protegiendo éste al mismo de la modificación con TNM y dando lugar a una protección parcial de la pérdida de actividad. Esto estaría de acuerdo con nuestros resultados y los encontrados en la Bibliografía (40), sin embargo se ha encontrado que ambos grupos -SH se -

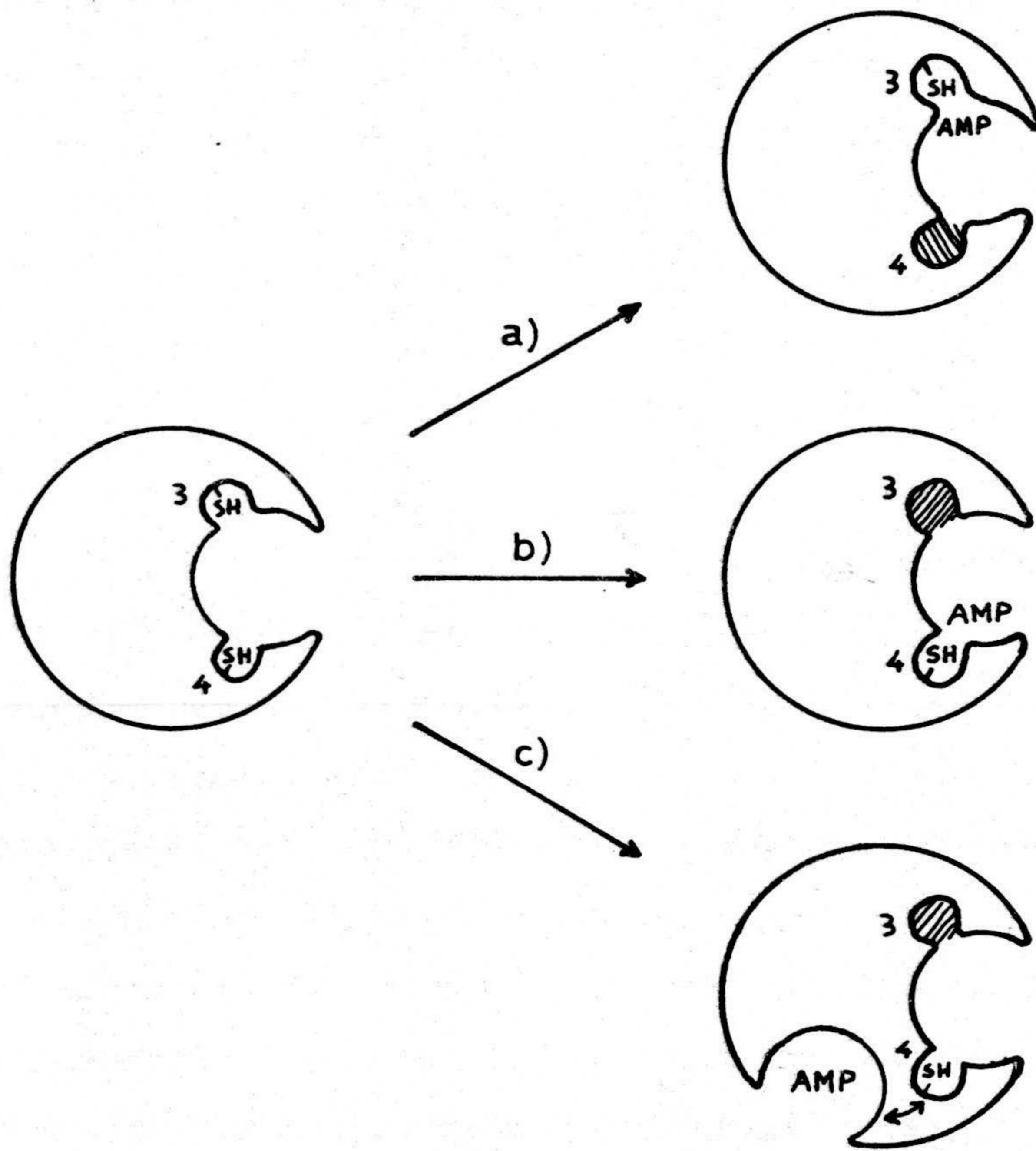


Fig. 65

pueden modificar con un reactivo bifuncional (31) indicando que están muy cerca, sería por tanto de esperar que la unión de AMP impidiera la modificación no de uno de ellos, sino de ambos. En la posibilidad c) el AMP está en un sitio distante de los correspondientes a estos grupos -SH, ejerciendo una fuerte interacción heterotrópica sobre el residuo del péptido nº 4. Esto querría decir que en presencia de AMP no se puede modificar el nº 4 con DTNB o TNM ejerciendo una parcial protección de la pérdida de actividad.

Resumiendo, nos inclinamos por la hipótesis esquematizada en c) de la figura 65, sin embargo la posibilidad b) de la misma figura no se puede desechar totalmente aunque parezca poco probable.

Este esquema alostérico explica nuestros resultados cualitativamente. A priori, no excluimos otros posibles, aunque dada la aceptación del modelo de Monod, incluso con fosforilasa, y su sencillez nos hemos inclinado por su aplicación. La confirmación de este modelo debería venir a través de un cálculo cuantitativo y medida de las constantes de velocidad de cada etapa. En este caso, dicho modelo matemático no es posible aplicarlo pues estas reacciones no son reversibles, en el sentido en el que le son aplicables las suposiciones iniciales de dicho modelo (108).

El estudio de los resultados cinéticos pueden completar la discusión anterior por lo que procedemos a realizarlo a continuación:

La variación de absorbancia a 381 nm., paralela a

la modificación de dos cisteínas "lentas", después de dos horas de iniciada la reacción con TNM, corresponde a la formación de dos iones nitroformiato, por mol de enzima. Puesto - que en estas condiciones (TNM/F = 10 y 2 horas de reacción) se modifican una tirosina y dos cisteínas "lentas", deberíamos esperar la formación de tres iones nitroformiato por mol de enzima. Puesto que en los mecanismos de reacción que hay propuestos en la bibliografía (56) se forma un ion nitroformiato tanto en la modificación de una tirosina como de un - grupo -SH, no entendemos como obtenemos menos iones nitroformiato de los que debieran. Una posibilidad sería que los productos de la modificación de cisteína, conducentes a oxidación irreversible de ésta, reaccionaran, a su vez, con más grupos -SH. De cualquier modo, se hace necesario realizar estudios posteriores para esclarecer este punto.

Según el esquema representado en la figura 66, en primer lugar se produciría el ataque químico por TNM seguido de un cambio de conformación. A continuación se produce la monomerización y posterior modificación química de más grupos -SH. Los periodos de semireacción de inactivación y de valoración de grupos -SH prácticamente coinciden (30-40 min.). Esto querría decir que la etapa de inactivación ha de ser previa y limitante del posterior ataque químico, es decir, la etapa 2.

Según los resultados expuestos en la figura 40 se podría deducir que la modificación de una tirosina no es decisiva - en la pérdida de actividad, sin embargo esto no se puede infe

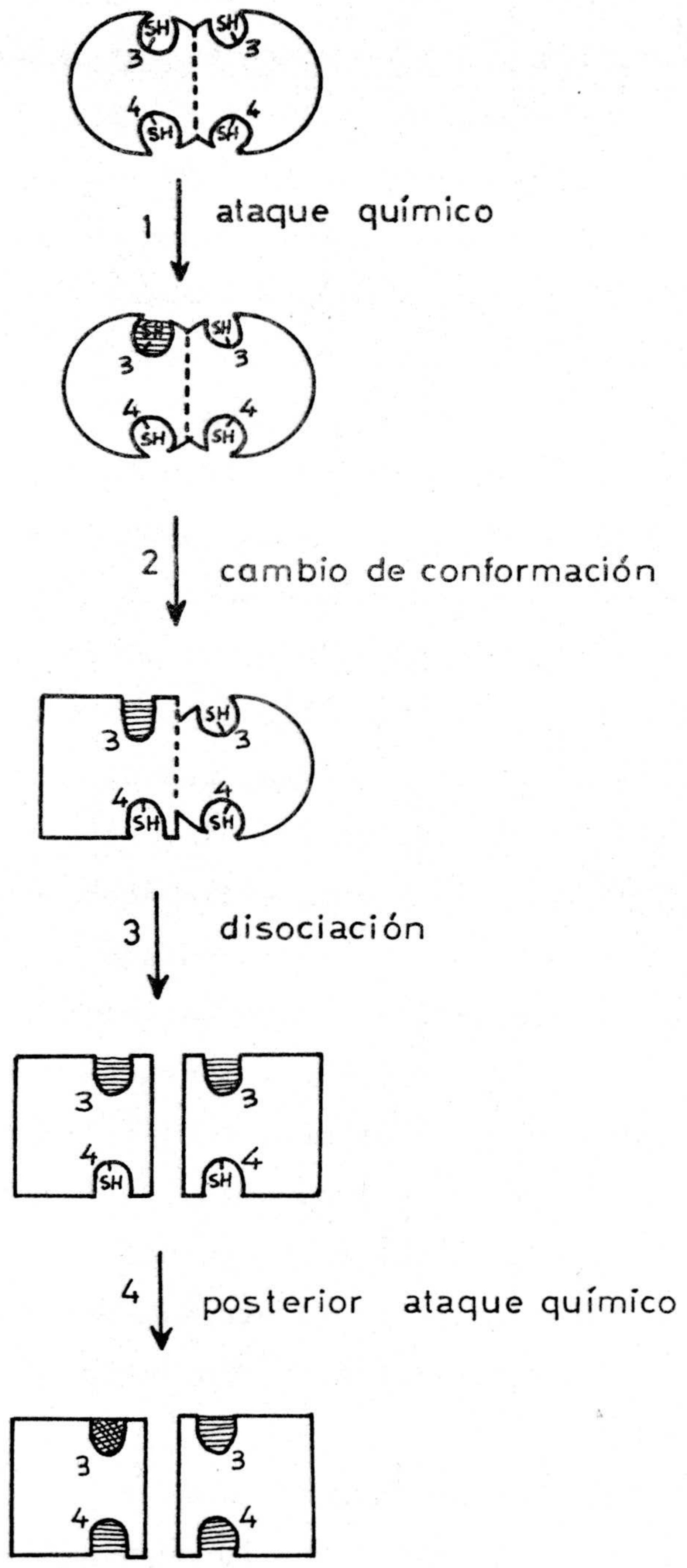


FIG. 66

rir, ya que según esos mismos resultados y los encontrados en compuestos modelo (56), la reacción con cisteína es más rápida que con tirosina. Podría ocurrir que el efecto de la reacción de una tirosina estuviera enmascarado por el efecto más rápido de la reacción de las cisteínas. No se podrían sacar conclusiones, de estos resultados, respecto del papel que pudieran desempeñar las tirosinas sobre las propiedades catalíticas de la enzima. Por esta razón se utilizó otro reactivo de tirosinas, la sal de Fremy, que presenta una mayor reactividad por las mismas y que no parecía reaccionar con compuestos modelo de cisteína (mercaptoetanol y L-cisteína).

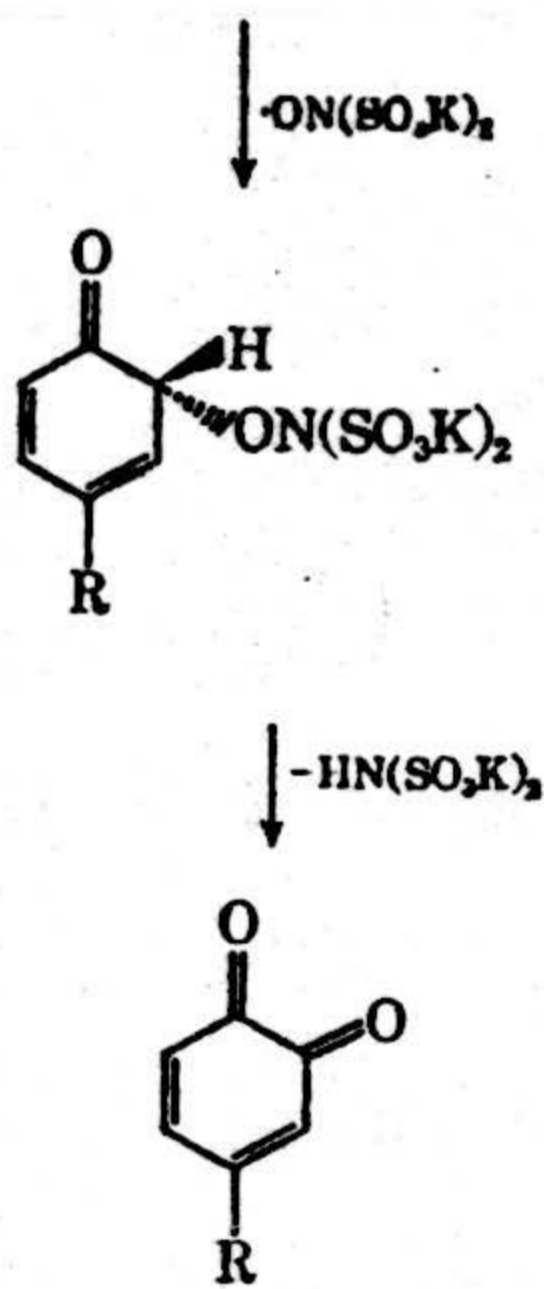
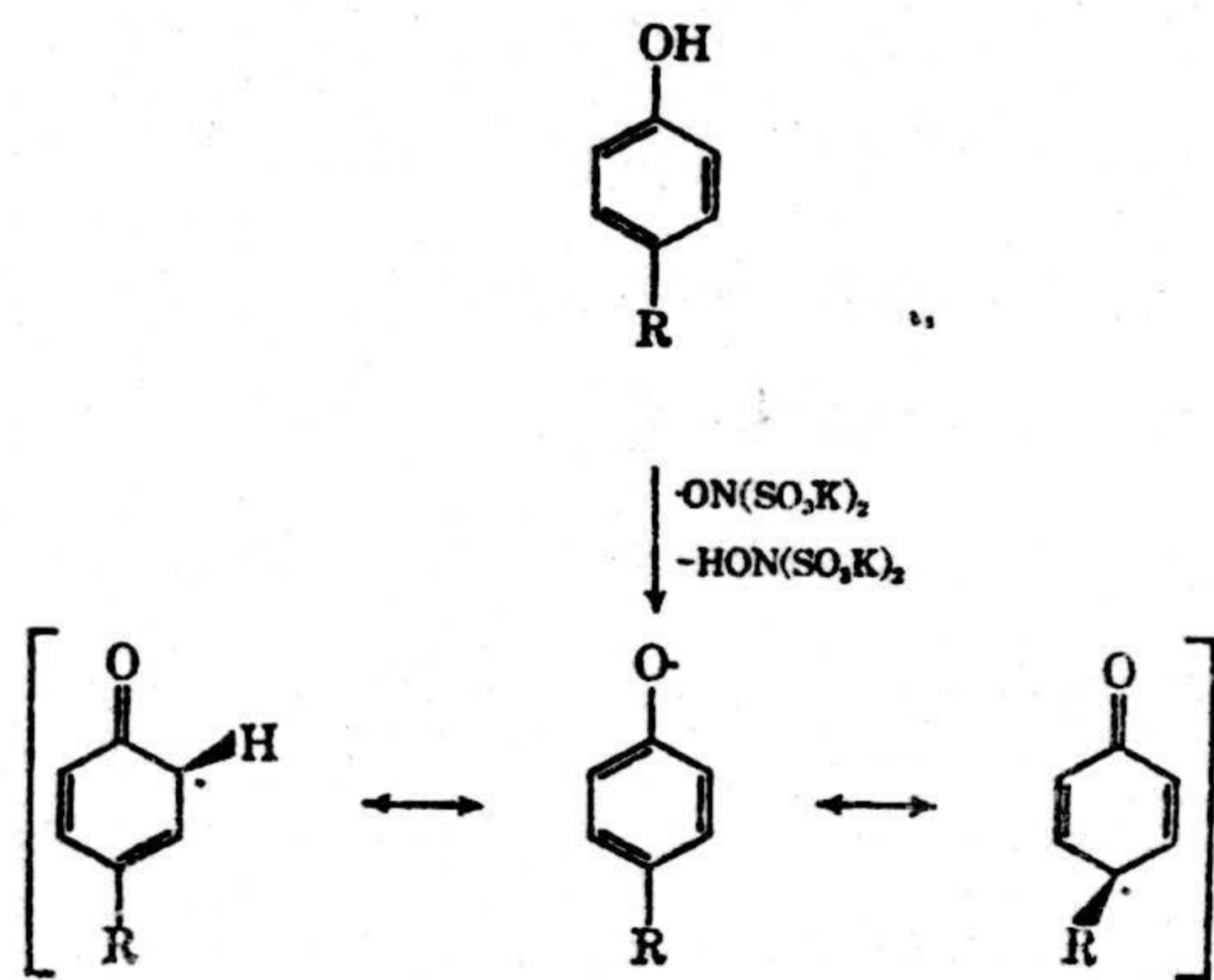
C) MODIFICACION QUIMICA
MEDIANTE EL USO DE SAL DE FREMY

Las condiciones óptimas para el tratamiento de fosforilasa con sal de Fremy se encontraron después de la realización de experimentos previos utilizando tiempos de reacción, así como cantidades de sal de Fremy, muy grandes. Como se puede observar en la figura 49, la inactivación de la enzima era prácticamente completa cuando se utilizaba una cantidad de sal de Fremy tal que la relación molar sF/F era aproximadamente igual a 10. Como ya se ha indicado en la discusión sobre los resultados obtenidos del tratamiento con TNM, estas condiciones son las preferibles al objeto de disminuir al máximo la multiplicidad de factores que puedan influir en la pérdida de actividad.

Utilizando las condiciones indicadas, se realizó el espectro de la enzima tratada con sal de Fremy, apareciendo tres bandas, figura 50, con máximos a 310-320 nm. , 380 nm. y 500 nm. La banda que aparecía a 380 nm., lo hacía en todas las condiciones en que se realizaron los experimentos, utilizando diversas concentraciones de enzima y de sal de Fremy, e incluso cuando la fosforilasa se "abría" con altas concentraciones de guanidina. Esta banda, además, resultaba ser proporcional al número de tirosinas que se modificaban con sal de Fremy. La banda que aparecía a 310-320 nm. no fue utilizada en ningún experimento ya que tanto la absorción del

PLP como de la propia enzima se hacen muy significativas a esa longitud de onda, impidiendo su utilización rutinariamente. En cuanto a la banda que aparecía a 500 nm., prácticamente desaparecía cuando la enzima se "abría" con un exceso de guanidina. Por otra parte, la absorbancia a esta longitud de onda no era proporcional al número de tirosinas modificadas en contrado por análisis de aminoácidos, mientras que si lo era a 380 nm. Por estas razones, la banda que presentaba un máximo a 380 nm. fue la que se utilizó en el cálculo del número de tirosinas que se modificaban por el tratamiento con sal de Fremy. Además, esta banda es la asignada por Dukler - et. al. (66) al producto de oxidación de péptidos conteniendo tirosina de forma que el grupo $-NH_2$ se encuentra bloqueado, no pudiendo formarse el "dopacromo", que presenta un máximo a 450 nm.

Una explicación al hecho de que la banda con máximo a 500 nm. desaparezca cuando se pone la enzima en presencia de guanidina, se podría dar a la luz del mecanismo de reacción de sal de Fremy con fenoles (65):



El radical intermedio que se forma es muy reactivo y podría adicionar protones del medio o bien otros grupos de la proteína que se encontraran en el mismo sitio; incluso, la quinona resultante es muy reactiva y podría dar lugar a productos de reacción de una forma no controlable. Concretamente, con aminas primarias y secundarias las quinonas dan diversos productos de reacción por lo que no nos extrañan los cambios espectrales observados en guanidina 3,5 M. Evidentemente, se hace necesaria una investigación más a fondo utilizando compuestos modelos que pudieran simular las condiciones de la tirosina en la enzima.

En cuanto a los resultados cinéticos, en las figuras 55 y 57 se observa que las condiciones experimentales influyen en la cinética de la reacción seguida a 500 nm. Utilizando una relación molar $sF/F = 10$, el máximo de absorbancia a 500 nm. se alcanza prácticamente a los 30-40 minutos, tiempo que es el mismo que resulta necesario para producir la inactivación de la enzima. La cinética responde a la modificación de dos tirosinas con una velocidad $K = 970 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Cuando se usa una relación molar $sF/F = 45,5$ la estabilidad en la absorbancia a 500 nm. se consigue mucho más tarde, cerca de las dos horas. En estas condiciones, el ajuste de la variación de absorbancia con el tiempo a una cinética de pseudo primer orden da como resultado la aparición de dos cinéticas. Una de ellas corresponde a la modificación de dos tirosinas

a una velocidad $K = 610 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$., comparable a la obtenida para el caso en que $sF/F = 10$, y a continuación se observa una cinética mucho más lenta correspondiente a dos tirosinas adicionales, obteniéndose un valor de $K = 22 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$. Esto podría significar que cuando la cantidad de sal de Fremy que se utiliza es muy grande, en primer lugar se modifican dos tirosinas que coinciden con aquellas que eran responsables de la pérdida de actividad, y a continuación se comienzan a modificar, mucho más lentamente, nuevas tirosinas que no son decisivas en el mantenimiento de las propiedades enzimáticas.

Esto último podría hacer pensar que todas las tirosinas se podrían modificar utilizando tiempos de reacción y cantidades de reactivo lo suficientemente grandes. En este sentido se realizó una experiencia utilizando un exceso de sal de Fremy tal que la relación molar $sF/F = 75$. Al cabo de 18 a 20 horas de iniciada la reacción, solamente 18 tirosinas habían sido modificadas. Esto último no quiere decir que si los tiempos se hacen aun mayores y las cantidades de reactivo se aumentan considerablemente no vayan a reaccionar más tirosinas, es posible que lo hicieran (a tiempos grandes) pero en esas condiciones ya no estamos valorando tirosinas en fosforilasa "nativa" puesto que esos tiempos y esas cantidades de reactivo, estarían produciendo sobre la enzima modificaciones no específicas que no permitirían decir nada sobre la naturaleza de la reacción. Podemos afirmar, pues, que un 50 % de las tirosinas, aproximadamente, se encuentra en una situación mucho menos reactiva que el otro 50%, seguramente ocluí

das en el interior de la molécula de fosforilasa, o bloqueadas de cualquier otra forma, por ejemplo formando puentes de hidrógeno.

En la figura 67 se da una somera clasificación de las tirosinas en fosforilasa según su reactividad con sal de Fremy. Como se puede observar, un 50% de estas tirosinas las suponemos ocluidas en sitios de difícil accesibilidad, como hemos dicho. Este concepto ya ha sido encontrado por diversos autores en el caso de las cisteínas (ver INTRODUCCION) y no es extraño que una situación del mismo tipo se de en las tirosinas. Por otra parte, el número máximo de tirosinas que se pueden modificar utilizando N-acetilimidazol (51) resulta ser análogo al encontrado por nosotros. Esto apoya aun más la suposición hecha de que el 50%, aproximadamente, de estos residuos de tirosina, se encuentran en la enzima en condiciones de menor accesibilidad. El 50% restante se encontraría expuesto a la superficie de la enzima, de forma que su reacción con sal de Fremy resulta posible; sin embargo, se puede decir de los resultados obtenidos, que la reaccionabilidad de estas tirosinas expuestas no es la misma en todas. Efectivamente aparecen dos tirosinas que son mucho más reactivas que el resto; esto sería lógico si estas dos tirosinas fueran decisivas en el mantenimiento de las propiedades enzimáticas, como así se puede deducir de los resultados obtenidos.

A continuación discutiremos el papel desempeñado por esas dos tirosinas en el mantenimiento de la actividad enzimática. De los resultados se deduce que la inactivación es paralela

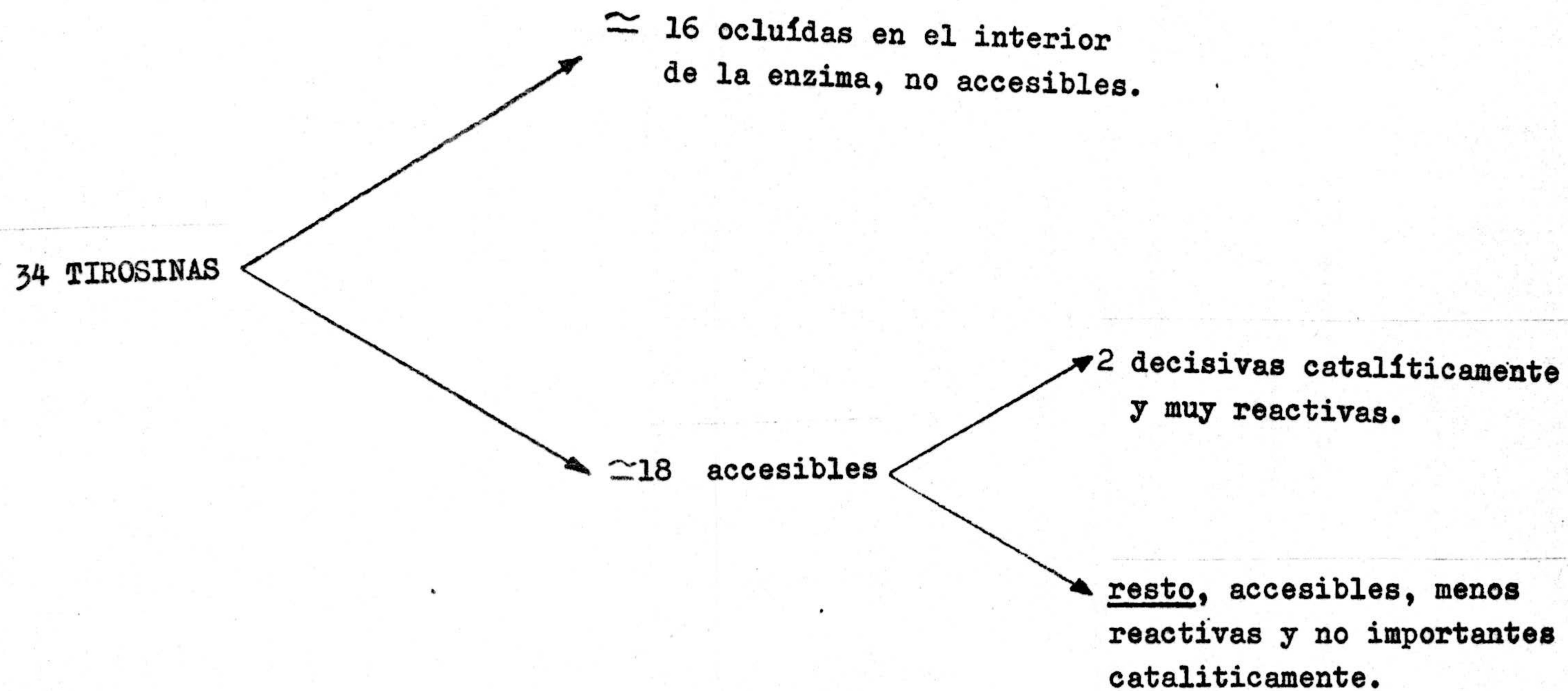


FIG 67

a la modificación de dos residuos de tirosina, presentando, tanto la cinética seguida a 500 nm. como la inactivación en función del tiempo, periodos de semireacción similares e iguales a cinco minutos. Podemos decir que la modificación de dos tirosinas en fosforilasa produce una total pérdida de actividad. Por otra parte, la presencia de AMP protege a la enzima de la citada pérdida de actividad y, simultáneamente, de la reacción de las dos tirosinas que se modifican en ausencia de AMP, en una extensión similar. Este resultado contrasta con el obtenido por Cacace et al. (51), quienes por reacción a temperatura ordinaria con N-acetilimidazol, encuentran que el AMP no protege de la pérdida de actividad, aunque si lo hace de la reacción de algunas tirosinas. Por el contrario, a 0 °C, el AMP protege de la inactivación y de la reacción de dos tirosinas.

Ambos hechos: inactivación y protección por AMP implican que estamos en un caso análogo al discutido anteriormente para el caso de las cisteínas. Es decir, 1-2 tirosinas se encuentran en el sitio catalítico, en el sitio del AMP, o bien en un sitio con fuertes interacciones heterotrópicas sobre el activador alostérico. En el caso de las cisteínas se disponía de datos sobre el comportamiento de las mismas frente a una gran cantidad de reactivos e incluso se podía distinguir entre las dos cisteínas responsables de la actividad. Aquí disponemos de muchos menos datos y al no poder distinguir cinéticamente las dos tirosinas, la discusión sobre su implicación en la inactivación de la enzima ha de ser más reducida

Teniendo en cuenta que una tirosina se ha encontrado en el péptido implicado en la unión del AMP a la fosforilasa (50), nos inclinamos por la posibilidad de que 1-2 tirosinas se encuentren en el sitio del efector. Ambas tirosinas no son cinéticamente distinguibles, pero cuando se utiliza un reactivo como el TNM, solamente puede ser modificada una tirosina como máximo, indicando esto que posiblemente, de las dos tirosinas modificadas con sal de Fremy, una de ellas es más reactiva que la otra y únicamente se pueden diferenciar cuando se utiliza un reactivo que presenta menos afinidad por tirosinas que la sal de Fremy, como es el TNM. No se puede desechar, por consiguiente, la posibilidad de que sea solamente una, la tirosina que está implicada en el sitio del AMP.

Cuando se utilizan concentraciones muy diferentes de enzima, los resultados no son comparables totalmente. No se tiene en la actualidad ninguna evidencia respecto de que la enzima presente un comportamiento distinto a lo largo del rango de $1-5 \cdot 10^{-5}$ M. a temperatura ambiente. Sin embargo, como se deduce de los resultados, cuando la concentración de fosforilasa es superior a $3 \cdot 10^{-5}$ M. observamos que el efecto de protección que ejerce el AMP prácticamente desaparece y, además, los resultados de la determinación del número de tirosinas modificadas son diferentes en este rango de concentración. Evidentemente se hace necesario prolongar estos estudios utilizando otros parámetros adicionales que pudie-

ran dar más luz a este hecho.

Finalmente, comentaremos la posibilidad de que otros restos aminoácidos distintos que la tirosina puedan haber sido modificados por el tratamiento que se ha descrito. En este sentido, el análisis de aminoácidos no detectó la modificación de Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe y Val; sin embargo, no se puede decir nada respecto al triptófano y cisteína mediante el análisis de aminoácidos que se realizó puesto que ambos sufren una destrucción de su naturaleza química original en el proceso de hidrólisis. En cuanto a cisteínas, como se puede deducir de los resultados, no son las causantes de la inactivación observada, aunque no se puede descartar su parcial modificación dada su extraordinaria reactividad. Queda, por consiguiente, el triptófano. Su determinación por análisis de aminoácidos no se puede realizar con exactitud, y utilizando la espectroscopía diferencial, las medidas están sometidas a grandes errores como consecuencia de la fuerte absorción que presenta el cromóforo resultante de la oxidación de tirosina en la región de los 300 nm, próxima a la de 288 nm. donde se determina dicho resto aminoácido. Por esta razón, no se puede descartar absolutamente una modificación de triptófano, sin embargo, si la sal de Fremy es un reactivo fundamentalmente de fenoles, cabe esperar que la modificación que pueda sufrir el triptófano cuando hemos modificado dos tirosinas sea prácticamente despreciable. Por último, también se ha comprobado que no se modifica el cofactor, PLP, por reac -

ción con sal de Fremy.

R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S

RESUMEN Y CONCLUSIONES

A continuación se expone un breve resumen del trabajo realizado:

a) Se ha obtenido y purificado la fosforilasa b de músculo esquelético de conejo.

b) Se ha puesto a punto la medida de la actividad específica de la enzima, obteniéndose niveles de la misma que oscilaban entre 80 y 100 unidades.

c) Hemos sintetizado y purificado el NN'-bis(ácido 2-etano sulfónico) piperazina, PIPES.

d) Para la modificación química de tirosinas se sintetizó y purificó la sal de Fremy, nitrosodisulfonato potásico.

e) Los complejos formados por el PLP y la albúmina fueron estudiados por espectroscopía de absorción y fluorescencia.

f) Se ha realizado polarografía de los complejos PLP-cisteína y PLP-albúmina. Igualmente, se ha hecho polarografía de albúmina, holofosforilasa y apofosforilasa.

g) La modificación química de fosforilasa, mediante el uso de TNM, fue estudiada haciendo uso de experiencias de inactivación, influencia del activador alostérico, AMP, valoración de restos de cisteína y tirosina, y estudios cinéticos.

h) Se estudió la modificación química de fosforilasa por medio de sal de Fremy, realizándose estudios de inactivación, reacción con compuestos modelo, influencia de AMP, espectroscopía, cinética, análisis de aminoácidos y valoración de los únicos restos aminoácidos modificados que se encontraron, tirosinas.

De estos estudios, se han obtenido las siguientes conclusiones más significativas:

1.- El complejo PLP-albúmina (sitio I) puede ser utilizado como un modelo que simula las propiedades del sitio del PLP en fosforilasa.

2.- A pH neutro, los complejos PLP-albúmina, así como la albúmina, holofosforilasa y apofosforilasa presentan ondas polarográficas de carácter catalítico atribuibles a los protones adsorbidos sobre la sustancia proteica.

3.- El PLP se une a la fosforilasa mediante una base de Schiff que se encuentra embebida en el interior de una bolsa hidrofóbica. La misma situación parece presentarse en el complejo PLP-albúmina (sitio I).

4.- Por fluorescencia, se ha encontrado transferencia de energía entre los triptófanos de la albúmina y el PLP unido al sitio I. Suponiendo un mecanismo de Perrin-Forster, la distancia entre ambos cromóforos sería de unos 20 Å.

5.- La diferencia que existe entre los sitios I y II en

albúmina, se debería únicamente a la polaridad de los mismos, siendo el sitio II de carácter más hidrofílico que el sitio I.

6.- El complejo PLP-albúmina (sitio II) y la fosforilasa "deformada" en citrato de imidazol presentan ondas de reducción análogas y atribuibles a la reducción de la base de Schiff mediante la cual se une el PLP a ambas proteínas.

7.- La imposibilidad de reducción con NaBH_4 , a pH neutro, del sitio I del PLP en albúmina y en fosforilasa, es de carácter termodinámico.

8.- El tratamiento de fosforilasa con TNM, en las condiciones más suaves encontradas para producir una inactivación total de la misma, da lugar a la modificación de cuatro residuos de cisteína y uno de tirosina por monómero de enzima.

9.- La curva obtenida acerca del número de cisteínas modificadas, por monómero de enzima, en función de la cantidad de TNM usada, ha sido relacionada con la inactivación enzimática de acuerdo con el modelo alostérico de Monod sobre interacciones homotrópicas.

10.- La capacidad de fijación de AMP por fosforilasa disminuye en un 50 %, aproximadamente, cuando la misma se modifica con TNM. Esto podría indicar que la causa de la inactivación fuese esta disminución de afinidad por el efector alostérico.

11.- Cuando la enzima se trata con TNM en presencia de AM
P, este efector ejerce una parcial protección sobre la pérdi
da de actividad, y también protege a la fosforilasa de la mo
dificación de una cisteína, probablemente por interacción he
terotrópica. Esto confirmaría la conclusión anterior y supon
dría la implicación de una cisteína en el sitio del AMP.

12.- La inactivación de una molécula de fosforilasa por
tratamiento con TNM parece ser consecuencia de la modifica -
ción de un residuo de cisteína (pep.nº3) de un monómero de
la misma. Posteriormente se produciría la disociación del dí
mero en monómeros.

13.- El tratamiento de la enzima con sal de Fremy modifi
ca dos residuos de tirosina por monómero, cuando se ha produ
cido la total inactivación, coincidiendo los periodos de se
mireacción de inactivación y de modificación de tirosina.
Otros residuos aminoácidos no se modifican significativamen
te.

14.- De las tres bandas de absorción que presenta el cro
móforo resultante de la oxidación de tirosina con sal de Fre
my, solo se pudo utilizar la que presenta su máximo a 380 nm,
en la determinación del número de tirosinas modificadas, ob
teniéndose un coeficiente de extinción molar $\epsilon_M = 700$

15.- Se ha realizado una somera clasificación de las tiro
sinas presentes en fosforilasa, llegándose a la conclusión

de que un 50 %, aproximadamente, de las mismas se encuentran ocluidas de alguna forma en el interior de la enzima, no siendo accesibles a la reacción con sal de Fremy. Del 50 % restante habría dos muy reactivas, dos más que lo son menos, y el resto que presentaría una reactividad inferior.

16.- El AMP protege a la enzima, cuando se trata con sal de Fremy, de la inactivación en una extensión (75%) análoga a la de protección de modificación de dos tirosinas (78%). Una tirosina, al menos, se encontraría implicada en el sitio de unión del AMP a la fosforilasa.

B I B L I O G R A F I A



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cori, C.F., Cori, G.T. y Green, A.A. (1.943) J. Biol. Chem. 151, 39.
- 2.- Krebs. E. G. y Fischer, E.H. (1956). Biochim. Biophys. Acta, 20, 150.
- 3.- Cori, C. F. y Cori, G.T. (1936). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 702.
- 4.- Parnas, M. J. K. y Mochnacka, I. (1936). C. R. Soc. Biol 123, 1173.
- 5.- Madsen, N.B. y Cori, C. F. (1956). J. Biol. Chem. 223, 1055.
- 6.- Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D. H. y Cori, C. F. (1957). Biocim. Biophys. Acta. 25, 16.
- 7.- Fukui, T. (1976). Mem. Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ. en prensa.
- 8.- Miller, S. L. y Urey, H. C. (1959). Science, N.Y., 130 , 245.
- 9.- Fischer, E. H., Pocker, A. y Saari, J. C. (1970). Essays. Biochem. 6, 23.
- 10.-Graves, J. D. y Wang, J. H. (1972). The Enzymes (Ed. P. D. Boyer) 7, 435.
- 11.-Ryman, B. E. y Vhelan, W. J. (1971). Adv. Enzymol. 34, 285.
- 12.-Larner, J. y Villar-Palasi, C. (1971). en "Current Topics in Cellular Regulation", 3, 196.
- 13.-Morgan, H. E. y Parmeggiani, A. (1964). J. Biol. Chem.

239, 2440

- 14.- Morgan, H. E. y Parmeggiani, A. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 252.
- 15.- Lyon, J. B. y Porter, J. (1963). *J. Biol. Chem.*, 238, 1.
- 16.- Johnson, L. N., Madsen, N. B., Mosley, J. y Wilson, K. S. (1974). *J. Mol. Biol.* 90, 703.
- 17.- Zarkadas, C. G., Smillie, L. B. y Madsen, N. B. (1968). *J. Mol. Biol.*, 38, 245.
- 18.- Gold, A. M. y Blockman, D. (1970). *Biochemistry*, 9, 4480
- 19.- Fischer, E. H. Comunicación Privada.
- 20.- Illingworth, B. Jansz, H. S., Brown, T. H. y Cori, C. F. (1958). *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 1180.
- 21.- Fischer, E. H., Kent, A. B., Sneider, E. R. y Krebs, E. G. (1958). *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2906.
- 22.- Fischer, E. H., Forrey, A. W., Hedrick, J. L., Hughes, R. C., Kent, A. B. y Krebs, E. G. (1963). en "Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis" (Eds. Snell, E. E., Fasella, P. M., Braunstein, A. y Rossi-Fanelli, A.) Oxford: Pergamon Press, p. 543.
- 23.- Guirard, B. M. y Snell, E. E. (1964). en "Comprehensive Biochemistry" Vol. 15 (Eds. Florkin, M. y Stotz, E. H.) Amsterdam: Elsevier, p. 138.
- 24.- Fischer, E. H. (1964) en "Structure and Activity of Enzymes" (Eds. Goodwin, T. W., Harris, I. I. y Hartley) Sympos. nº 1, Fedn. European Biochemical Societies, London: Academic Press, p. 111.

- 25.- Hedrick, J. L. y Fischer, E. H. (1965). *Biochemistry*, 4, 1337.
- 26.- Kent, A. B., Krebs, E. G. y Fischer, E. H. (1958). *J. Biol. Chem.*, 232, 549.
- 27.- Stransbaugh, P. H., Kent, A. B., Hedrick, J. L. y Fisher, E. H. (1967). *Methods Enzymol.* 11, 671.
- 28.- Cortijo, M., Steinberg, I. Z. y Shaltiel, S. (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 933.
- 29.- Shaltiel, S. y Cortijo, M. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41, 594.
- 30.- Cortijo, M. y Shaltiel, S., (1972). *Eur. J. Biochem.* 29, 134
- 31.- Shaltiel, S., Cortijo, M. y Zaindenzaig, Y. (1972). en - "Metabolic Interconversion of Enzymes" (Eds. Wieland, O., Helmreich, E., y Holzer, H.) Berlin: Springer Verlag, p. 72.
- 32.- Johnson, G.F., Tu, J.I., Shonka-Bartlett, M.L., y Graves, D.J. (1970). *J. Biol Chem.* 245, 5560.
- 33.- Jones, C. y Cowgill, R.W. (1971). *Biochemistry*, 10, 4276.
- 34.- Honikel, K.O. y Madsen, N.B. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247, 1057.
- 35.- Llor, J., Tesis Doctoral, Murcia, (1973).
- 36.- Madsen, N.B. (1956) *J. Biol. Chem.*, 223, 1067.
- 37.- Zarkadas, C.G., Smillie, L.B. y Madsen, N.B. (1970) *Can. J. Biochem.*, 48, 763.
- 38.- Battell, M. L., Smillie, L. B. y Madsen, N. B. (1968) . *Can. J. Biochem.*, 46, 609.

- 39.- Battell, M. L., Zarkadas, C. G., Smillie, L. B. y Madsen, N. B. (1968). *J. Biol. Chem.*, 243, 6202.
- 40.- Kleppe, K. y Damjanovich, S. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.*, 185, 88.
- 41.- Buc-Caron, M. H. Ph. D. Thesis. Paris, 1970.
- 42.- Hedrick, J. L., Shaltiel, S. y Fischer, E. H. (1969). *Biochemistry*, 8, 2422.
- 43.- Avramovic-Zikic, O., Smillie, L. B. y Madsen, N. B. (1970). *J. Biol. Chem.*, 7, 1558.
- 44.- Huang, C. Y. y Madsen, N. B. (1966). *Biochemistry*, 5, 116.
- 45.- Philip, G., y Graves, D. J. (1968). *Biochemistry*, 7, 2093.
- 46.- Fasold, H., Keller, F., Halbach, M. y Helmreich, E. (1969) *Federation Proc.*, 28, 847.
- 47.- Vulfson, P. L. y Kozlova, N. B. (1968). *Biokhimiya*, 33, 658.
- 48.- Wang, J. H. y Tu, J. I. (1969). *Biochemistry*, 8, 4403.
- 49.- Anderson, R. A. y Graves, D. J. (1972). *Federation Proc.* 31, 833.
- 50.- Anderson, R. A., Parrish, R. F. y Graves, D. J. (1973). *Biochemistry*, 10, 1901.
- 51.- Cacace, M. G., Diprisco, G. y Zito, R. (1976). *Febs letters*, 62, 338.
- 52.- Herriot, R. M. (1947). *Advan. Protein Chem.*, 3, 170.
- 53.- Wormall, A. (1930). *J. Exptl. Med.* 51, 295.
- 54.- Ehsenberg, L., Fischer, I. y Lofgren, N. (1946). *Nature*

157, 730.

- 55.- Astroup, T. (1948). Acta Chem. Scand., 1, 744.
- 56.- Sokolovsky, M., Riordan, J. F. y Valle, B. L. (1966).
Biochemistry, 5, 3582.
- 57.- Riordan, J. F., Sokolovsky, M. y Valle, B. L. (1967).
Biochemistry, 6, 3609.
- 58.- Riordan, J. F. y Christen, P. (1968). Biochemistry, 7,
1525.
- 59.- Sokolovsky, M. y Riordan, J. F. (1969). Israel J. Chem.
7, 575.
- 60.- Beaven, G. H. y Gratzner, W. B. (1968). Biochim. Biophys.
Acta, 168, 456.
- 61.- Moser, W. y Howie, R. A. (1968). J. Chem. Soc. A. 3039.
- 62.- Howie, R. A., Glasser, L. S. D. y Moser, W. (1968). J.
Chem. Soc. A. 3043.
- 63.- Sing, R. P. (1966). Can. J. Chem., 44, 1994.
- 64.- Murib, J. H. y Ritter, D. M. (1952). J. Am. Chem. Soc.,
74, 3394.
- 65.- Zimmer, H., Lankin, D. C. y Horgan, S. W. (1971). Chem.
Reviews, 71, 229.
- 66.- Dukler, S., Wilchek, M. y Lavie, D. (1971). Tetrahedron
27, 607.
- 67.- Sizer, I. W. (1953). Adv. in Enzymology, 14, 129.
- 68.- Cory, J. G. y Frieden, E. (1967). Biochemistry, 6, 121.
- 69.- Lissitzky, S. y Rolland, M. (1962). Biochim. Biophys.
Acta, 56, 95.
- 70.- Homer, R. B., Allsopp, S. R. y Arrieta, J. E. (1975).

Febs Letters, 59, 173.

- 71.- Fischer, E. H., Krebs, E. G. y Kent, A. B. (1958). Biochem. Prep., 6, 68.
- 72.- Krebs, E. G., Love, D. S., Bratvold, G. E., Tryser, K. A., Meyer, W. L. y Fischer, E. H. (1964). Biochemistry, 3, 1022.
- 73.- Fischer, E. H. y Krebs, E. G. (1958). J. Biol. Chem., 231, 65.
- 74.- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E. (1968). Biochemistry, 7, 3590.
- 75.- Buc, M. H. y Buc, H. (1967). 4º congreso de la Febs, Oslo.
- 76.- Seery, V. L., Fischer, E. H. y Teller, D. C. (1967). Biochemistry, 6, 3315.
- 77.- Shaltiel, S., Hedrick, J. L. y Fischer, E. H. (1966). Biochemistry, 5, 2108.
- 78.- Peterson, E. A. y Sober, H. A. (1954). J. Am. Chem. Soc. 76, 169.
- 79.- Shaltiel, S., Hedrick, J. L. y Fischer, E. H. (1967). Methods Enzymol., 11, 675.
- 80.- Dempsey, W. B. y Christensen, H. N. (1962). J. Biol. Chem., 237, 1113.
- 81.- Jonas, A. y Weber, G. (1971). Biochemistry, 10, 1335.
- 82.- Chen, R. F. (1967). J. Biol. Chem., 242, 173.
- 83.- Sober, H. A. (Ed.). (1973). "Handbook of Biochemistry", Cleveland, CRC press.
- 84.- Marvel, C. S. y Sparberg, M. S. (1943). en "Organic Syn

- theses, Coll. Vol. II". (Ed. Blatt, A. H.). N. Y., Wiley. p. 558.
- 85.- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N. Izawa, S. y Singh, R. M. M. (1966). *Biochemistry*, 6, 467.
- 86.- Snell, F. D. y Snell, C. T. (1959). "Colorimetric Methods of Analysis". Vol. II A. Von Nostrand, p. 555.
- 87.- Helmreich, E. y Cori, C. F. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51, 131.
- 88.- Palter, K. y Lukton, A. (1973). *Anal. Biochemistry*, 53, 613.
- 89.- Ellman, G. L. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 443.
- 90.- Edelhoch, H. (1967). *Biochemistry*, 6, 1948.
- 91.- Winzor, D. J. (1969). en "Physical Principles of Protein Chemistry" Parte A. (Ed. Leach, S. J.) London, Academic Press, p. 491.
- 92.- Manousek, O. y Zuman, P. (1964). *Collection Czech. Chem. Comm.*, 29, 1718.
- 93.- Zuman, P. y Perrin, Ch. L. (1969). "Organic Polarography". Interscience. N. Y.
- 94.- Christensen, H. N. (1958). *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 99.
- 95.- Kolthoff, I. M. y Lingane, (1952). "Polarography". Interscience. N. Y. p. 291.
- 96.- Glover, D. J. y Landsman, S. G. (1964). *Anal. Chem.* 36, 1690.
- 97.- Busby, S. J. W. y Radda, G. K. (1976). Manuscrito en prensa.
- 98.- Cortijo, M., Llor, J., Jiménez, J. S., y García-Blanco,

- F. (1976) Eur. J. Biochem., en prensa.
- 99.- Llor, J. y Cortijo, M. (1976). J. Chem. Soc., enviado para su publicación.
- 100.-Kosower, E. M. (1958). J. Am. Chem. Soc., 80, 3253.
- 101.-Brand, L. y Witholt, B. (1967). Methods Enzymol., 11, 776.
- 102.-Putnam, F. W. (1965). Proteins, 3, 187.
- 103.-Scheller, F. y Will, H. (1973). Febs Letters, 29, 47.
- 104.-Santhanam, K. S. V. y Elving, P. J. (1974). J. Am. Chem Soc., 96, 1653.
- 105.-Auld, D. S. y Buice, T. C. (1967). J. Am. Chem. Soc., 89, 2083.
- 106.-Hedrick, J. L., Shaltiel, S. y Fischer, E. H. (1966). Biochemistry, 5, 2117.
- 107.-Gardiner, J. A., Collat, J. W. (1965). J. Am. Chem. Soc 87, 1692.
- 108.-Monod, J., Wyman, J. y Changeaux, J. P. (1965). J. Mol. Biol., 12, 88.
- 109.-Eagles, P. A. M. y Johnson, L. N. (1972). J. Mol. Biol. 64, 693.
- 110.-Eagles, P. A. M., Igbal, M., Johnson, L. N., Mosley, J. y Wilson, K. S. (1970). J. Mol. Biol., 64, 693.
- 111.-Baumert, H. G., Fasold, H., Keller, F., Halbach, M. y Ortanderl, F. (1973). Febs Letters, 31, 23.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. Enrique Montoya
- D. Fidel J. Lopez Aparicio
- D. Antonio Roig Muntaner
- D. Francisco Garcia Blanco
- D. Mammel Cortijo Mérida

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don Juan S. Jimenez Martinez se acordó por Unanimidad otorgar la calificación de Sobresaliente (cum Laude) y para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.


Granada, a 2 de Julio de 1976
El Secretario,

El Presidente,



F. Garcia

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,

